

Spécificités fonctionnelles des canaux calciques de type T et leurs rôles dans la différenciation neuronale

par Jean Chemin, Arnaud Monteil et Philippe Lory*

Laboratoire de Génomique Fonctionnelle - CNRS UPR 2580-IGH - 141, rue de la Cardonille, F-34094 Montpellier cedex 05, France

* Correspondance : Philippe Lory - Tel : 33 (0) 499 619 939 - Fax : 33 (0) 499 619 901

Email : philippe.lory@igh.cnrs.fr

Reçu le 5 mai 2003

RÉSUMÉ

Le rôle de l'ion Ca^{2+} dans la signalisation cellulaire est largement reconnu. Les canaux calciques de type T (canaux T) constituent une voie d'entrée de calcium très particulière dans la cellule car ils présentent des caractéristiques spécifiques sur le plan fonctionnel. Ces canaux sont activés pour de très faibles dépolarisations membranaires. Ils peuvent également induire une entrée importante de calcium en générant un courant de fenêtre durant des périodes très précises du développement, ainsi que dans certaines situations physiopathologiques. Les hypothèses concernant le rôle physiologique et physiopatho-

logique des canaux de type T dans l'évolution du phénotype cellulaire sont nombreuses : prolifération cellulaire, différenciation cellulaire, activation de gènes, sécrétion d'hormones, ... mais restent encore mal définies dans le contexte des études actuelles. Récemment, la génération d'outils moléculaires spécifiques suite au clonage des ADN complémentaires de ces canaux a permis de démontrer leur rôle dans la différenciation neuronale. Les données récentes obtenues par notre équipe qui indiquent une implication des canaux T générés par la sous-unité α_{1H} dans la différenciation neuronale sont présentées et discutées dans cet article.

SUMMARY Functional specificities of type T calcium channels and roles in neuronal differentiation

Calcium plays a central role in cell signaling and T-type calcium channels constitute a unique route for the entry of calcium ions in excitable cells. The genuine electrophysiological properties of T-type calcium channels include activation at low voltages and window currents in the range of cell membrane resting potential. T-type channels therefore generate a specific calcium influx likely to play an important role during early stages of development, in various cellular functions including cell proliferation, cell differentiation, gene transcription and hormone secre-

tion. Such T-channel activities are also associated with several pathological situations. With the recent cloning of three T-type pore channel subunits, α_{1G} , α_{1H} and α_{1I} (also called $Ca_v3.1$, $Ca_v3.2$ and $Ca_v3.3$, respectively), it has become possible to investigate further the role of T-type channels in various cellular functions, including neuronal differentiation. Here we describe recent data obtained in our laboratory demonstrating how T-type channels generated by the α_{1H} subunit contribute to neuronal differentiation.

LA DESCRIPTION ÉLECTROPHYSIOLOGIQUE DES CANAUX CALCIFIQUES DE TYPE T

L'augmentation de la concentration en Ca^{2+} intracellulaire entraîne une variété de processus physiologiques tels que la contraction musculaire, la sécrétion d'hormones et de neurotransmetteurs, la plasticité synaptique ou encore l'expression de gènes. Bien que beaucoup de mécanismes soient impliqués dans la régulation de

l'homéostasie du calcium intracellulaire, les canaux calciques activés par la dépolarisation membranaire jouent un rôle majeur dans ce processus sur les cellules excitables (Berridge *et al.*, 2000). L'existence de canaux calciques activés par la dépolarisation membranaire a été proposée par Fatt et Katz (1953) qui, en enregistrant les courants des fibres musculaires de la patte de crabe, démontrèrent que celles-ci restaient excitables lorsque le milieu extra-cellulaire ne contenait que des ions Ca^{2+} , Mg^{2+} et K^+ . Il existait donc des potentiels d'action qui

n'étaient pas sodiques et ne pouvaient être produits que par un influx de Ca^{2+} ou de Mg^{2+} ou par un efflux d'un anion intra-cellulaire. Plus tard, l'existence de potentiels d'action calcique a été confirmée par Hagiwara et Naka (1964). Très tôt les courants calciques apparaissent hétérogènes : sur la même préparation membranaire peuvent coexister plusieurs types de courants calciques caractérisés par des propriétés électrophysiologiques très différentes. En 1975, Hagiwara et collaborateurs distinguent deux types de courants calciques sur l'ovocyte d'Étoile de mer, sur la base de leur sélectivité ionique, leur seuil d'activation et leur inactivation. Il s'agit là des premières évidences pour l'existence de courants calciques de type T (pour *transitoire*), à bas seuil d'activation - LVA (pour *low voltage-activated*) - (voir Fig. 1). Par la suite, ces multiples conductances calciques furent décrites dans de nombreuses autres préparations, musculaires, neuronales et neuro-endocrines, aussi bien chez les invertébrés que chez les vertébrés (pour revues, Hagiwara & Byerly, 1981 ; Kostyuk, 1990 & 1999).

C'est au début des années 80 que les premières expériences décrivant à la fois les propriétés électrophysiologiques et suggérant un rôle biologique des canaux calciques de type T (canaux T) ont été effectuées. Llinás et Yarom, en 1981, ont décrit les propriétés d'un courant calcique à bas seuil d'activation sur les neurones du noyau de l'olive inférieure par des enregistrements en courant imposé sur des préparations en tranches. Des potentiels d'action calciques bas seuil associés à l'activité des canaux T furent ensuite identifiés dans diverses structures du système nerveux central et périphérique. D'abord décrites par les enregistrements en courant imposé, les propriétés des canaux T ont été confirmées et étudiées par les enregistrements en potentiel imposé dans divers types de neurones de vertébrés (Carbone & Lux 1984). Ce sont ces auteurs qui ont proposé la terminologie de courants calciques à bas seuil d'activation (LVA) que l'on distingue des courants à haut seuil d'activation (HVA, high voltage activated) alors que, dans la même période, Tsien et collaborateurs (Nowycky *et al.*, 1985 ; Nilius *et al.*, 1985) ont dénommé ces canaux calciques types T, pour *transitoire*, en référence à leurs propriétés d'inactivation à cinétique rapide (Fig. 1). Pour résumer les très nombreuses études en patch-clamp effectuées au cours des années 80, des courants calciques de type T ont été identifiés sur de très nombreux types cellulaires : neurones, myocytes cardiaques, cellules musculaires squelettiques et vasculaires, cellules sécrétrices, ostéoblastes, fibroblastes, cellules neuro-endocrines (pour revues, Bean, 1989 ; Kostyuk, 1990).

LES PROPRIÉTÉS PHYSIOLOGIQUES DES CANAUX CALCIFIQUES DE TYPE T

Au niveau neuronal

L'influx d'ions Ca^{2+} via les canaux calciques de type T (canaux T) peut dépolariser la membrane cellu-

laire et activer d'autres canaux ioniques. Cette propriété est particulièrement importante pour les canaux T neuronaux qui peuvent produire des potentiels d'action bas seuil (*low threshold spike*), conduisant à une activité en bouffée (*firing*) et un comportement électrique oscillant typique de certains neurones, du thalamus et de l'olive en particulier. Une caractérisation biophysique détaillée du courant T des neurones thalamiques a permis de

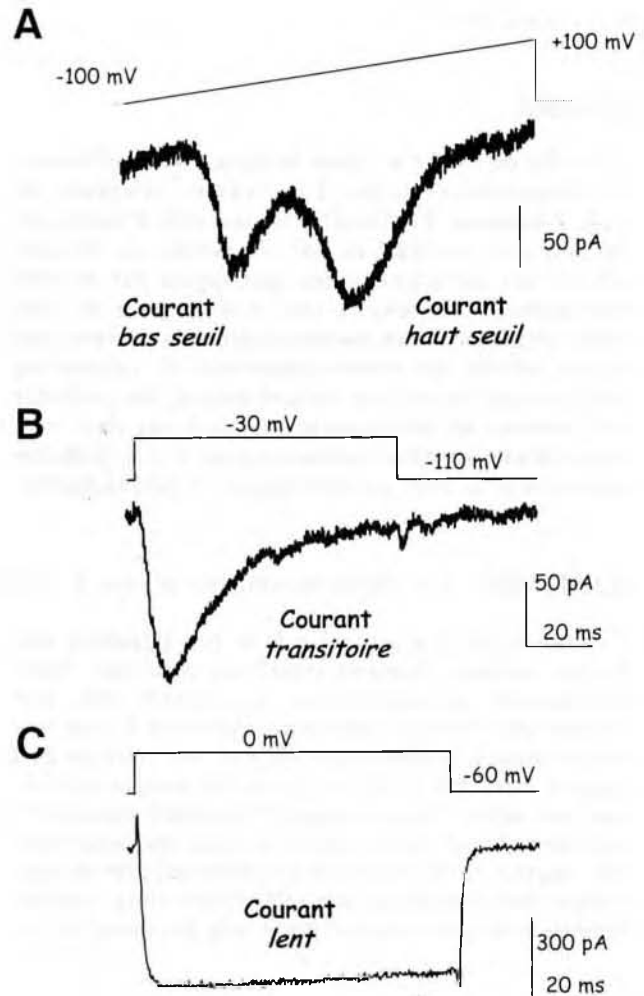


FIG. 1 – Enregistrement de courants calciques de type T sur les neurones différenciés du neuroblastome NG108-15 par la technique de patch-clamp en présence de 2 mM de calcium extracellulaire (voir Chemin *et al.*, 2002b pour les protocoles détaillés). **A** – Enregistrement de courants calciques « bas seuil » (low voltage-activated : LVA) et « haut seuil » (high voltage-activated : HVA) en utilisant un protocole de rampe de voltage (de -100 mV à +100 mV). **B** – Enregistrement d'un courant « bas seuil » (LVA) et transitoire : type T (potentiel de maintien à -110 mV et pic à -30 mV). **C** – Enregistrement d'un courant « haut seuil » (HVA) et de cinétique lente (potentiel de maintien à -60 mV et pic à 0 mV). Ce courant HVA est composé de courants de type L, de type N, de types P/Q et de type R.

confirmer l'implication des canaux T dans la genèse d'activité rythmique. Les propriétés d'activation et d'inactivation des canaux T neuronaux définissent la gamme de potentiel dans laquelle ces canaux sont actifs. Dans les neurones qui présentent des potentiels membranaires compris entre -70 et -90 mV les canaux T sont activés et jouent un rôle pacemaker suite à un potentiel post-synaptique excitateur *dépolarisant* (PPSE) qui, en cascade, activera les canaux sodiques et les canaux calciques HVA. Sur des neurones présentant des potentiels membranaires plus élevés que -70 mV les canaux T sont activés suite à un potentiel post-synaptique inhibiteur *hyperpolarisant* (PPSI). Le PPSI enclenche un rebond d'activité des canaux T en relation avec leurs propriétés de réaction rapide. Il peut exister des arythmies thalamo-corticales décrivant une évolution pathologique de ces oscillations que l'on retrouve dans une large gamme de désordres neurologiques tels que les épilepsies de type absence, certains syndromes neuropsychiatriques et certains types de douleurs (Fig. 2). Les canaux T se localiseraient préférentiellement au niveau dendritique et joueraient de fait un rôle important dans l'amplification de la signalisation électrique. L'activité des canaux T s'avère particulièrement importante au niveau de l'intégration sensorielle, de l'olfaction, la vision, mais aussi dans le cycle veille-sommeil (pour revue, Huguenard, 1996).

Au niveau cardiaque

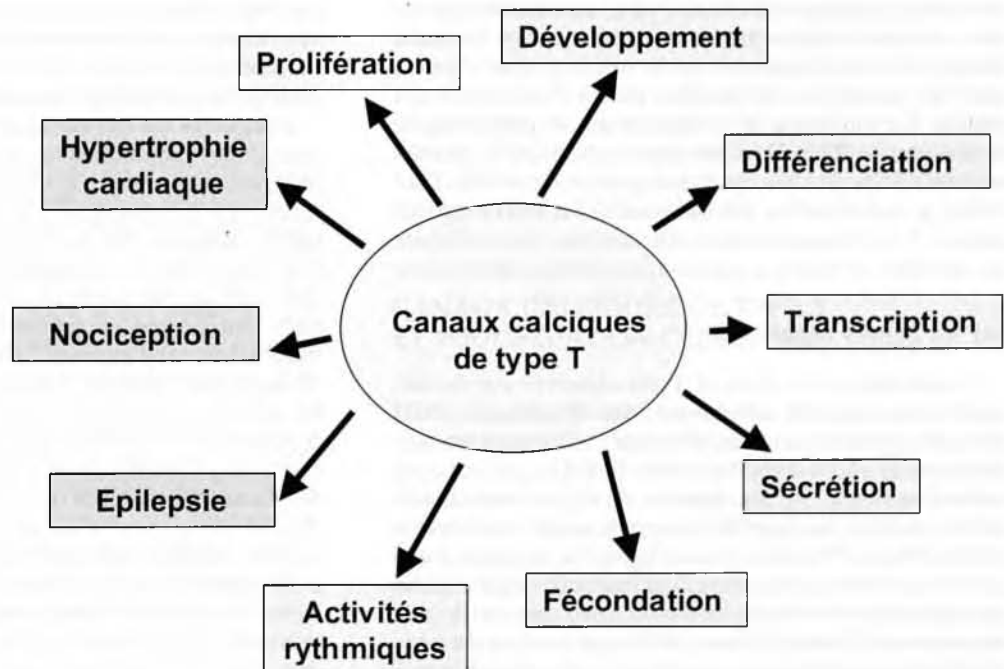
Les canaux T cardiaques sont préférentiellement exprimés au niveau du tissu conducteur et des cellules générant l'activité rythmique cardiaque : les cellules « *pace-*

maker ». Leur expression au niveau ventriculaire n'est retrouvée que sur quelques espèces (ex. Chien, Cobaye, Hamster) et absente chez l'Homme, le Rat et la Souris entre autres. Chez ces espèces, l'expression des canaux T serait limitée aux stades précoces du développement embryonnaire et postnatal (Leuranguer *et al.*, 2000; Ferron *et al.*, 2002). Les courants T cardiaques ressemblent fortement aux canaux T neuronaux même s'il existe quelques spécificités. A titre d'exemple, les canaux T cardiaques sont plus résistants que les canaux T neuronaux au nickel : un cation bloqueur des canaux T (Leuranguer *et al.*, 2000). Les canaux T cardiaques participeraient majoritairement à l'activité pacemaker (Hagiwara *et al.* 1988; Huser *et al.* 2000). L'expression au stade post-natal des canaux T sur les myocytes auriculaires suggèrent que ces canaux joueraient un rôle dans la sécrétion du facteur atrial natriurétique (Leuranguer *et al.*, 2000). Dans ce cas, l'activité des canaux T ne passerait pas par une augmentation transitoire de la concentration calcique intracellulaire consécutive à une dépolarisation membranaire mais via un « *courant de fenêtre* » résultant d'un influx d'ions Ca^{2+} dans la gamme du potentiel de repos des cellules (Chemin *et al.*, 2000).

Au niveau des muscles lisses

Des courants T de petite amplitude ont été retrouvés sur de nombreux muscles lisses vasculaires tels que les cellules musculaires coronaires, aortiques, mésentériques et les artéioles. Toutefois cette expression est dépendante de l'espèce considérée, voire de la mise en culture. Chez l'Homme par exemple, on ne retrouve pas de cou-

FIG. 2 – Diagramme schématisant les nombreuses hypothèses reliant les canaux de type T à la physiologie et la physiopathologie.



rant T au niveau des cellules musculaires des vaisseaux coronaires fraîchement dissociées mais ces courants apparaissent sur les cellules en culture (Quignard *et al.*, 2001). Il est important de noter que l'expression des canaux T au niveau des cellules vasculaires en culture dépend de l'état prolifératif de ces cellules. Les courants T sont enregistrés sur les cultures peu confluentes et disparaissent sur les cultures confluentes ne proliférant plus (Richard *et al.*, 1992). En fait, l'expression des canaux T est limitée aux cellules en phase G0/G1 (Kuga *et al.*, 1996) suggérant que ces canaux participeraient d'une certaine manière au phénotype prolifératif de ces cellules.

Au niveau du muscle squelettique

Des courants T sont retrouvés sur les cellules musculaires des animaux jeunes, voire embryonnaires. Chez la Souris, le pic d'expression des courants T se situe vers le stade embryonnaire E16, une période critique dans la maturation du muscle squelettique (Berthier *et al.*, 2002). Sur les animaux nouveau-nés, le courant T disparaît rapidement suggérant un rôle spécifique dans le développement du muscle squelettique. D'ailleurs, une étude récente démontre que les canaux T des cellules musculaires squelettiques participeraient à la fusion des myoblastes pour former les myotubes (Bijlenga *et al.*, 2000).

Sur les autres tissus

Au niveau rénal, on retrouve des canaux T au niveau du glomérule afférent et les vaisseaux afférents. Les canaux T joueraient un rôle dans la réabsorption calcique. Les cellules spermatogéniques expriment des canaux T présentant un profil pharmacologique particulier. Ils sont bloqués par les dihydropyridines inhibitrices des canaux calciques HVA de type L, ou encore le pimozide. Ils sont modulés par les tyrosine kinases. La phase initiale de l'accroissement de la concentration du Ca^{2+} dans le spermatozoïde semble due à l'ouverture des canaux T en réponse à la dépolarisation membranaire induite par le ZP3, l'un des composants de la matrice extracellulaire de l'ovocyte (Arnoult *et al.*, 1999). Toutefois, la coordination des mécanismes d'activation des canaux T et d'augmentation du calcium intracellulaire qui aboutit à la réaction acrosomique reste à déterminer.

Sur les lignées cellulaires

La présence d'un courant T est observée sur de très nombreuses lignées cellulaires : les fibroblastes (NIH 3T3), les lignées d'origines tumorales telles que les neuroblastomes (N1E-115, NG 108-15, IMR-32), les rétinoblastomes (Y79), les lignées d'origine musculaire (AT-1, A7r5), les lignées issues de tissus sécrétoires (GH3, INS-1). Plusieurs de ces lignées n'expriment que les canaux calciques de type T et leur utilisation a fortement contribué à l'étude de ces canaux tant sur le plan biophysique (Chen & Hess, 1990) que sur le plan phénotypique, en particulier concernant le rôle des canaux T

dans la prolifération et la différenciation cellulaire (voir plus loin).

CLONAGE ET EXPRESSION FONCTIONNELLE DES CANAUX CALCIFIQUES DE TYPE T

Il convient tout d'abord de noter qu'il s'est écoulé environ 20 ans entre l'identification électrophysiologique des courants T (Hagiwara & Byerly, 1981) et le premier clonage moléculaire d'une sous-unité α_1 codant pour un canal calcique de type T (Peres-Reyes *et al.*, 1998), soit 10 ans après le clonage de la première sous-unité α_1 du canal calcique de type L du muscle squelettique : la sous-unité α_{1S} (Tanabe *et al.*, 1987). La première difficulté rencontrée pour le clonage des sous-unité α_1 des canaux T réside dans le fait qu'il n'existe aucun ligand spécifique pour les canaux T susceptible d'être utilisé pour une stratégie de purification biochimique comme l'ont été les dihydropyridines pour les canaux calciques HVA de type L (Tanabe *et al.*, 1987) ou encore les toxines spécifiques des canaux calciques HVA neuronaux N et P/Q (Fig. 3). D'autre part, l'utilisation de techniques de clonage d'ADN complémentaires (ADNc) basées sur le criblage à faible stringence de banques d'ADNc ou encore sur des stratégies en RT-PCR utilisant des amorces dégénérées n'ont également pas abouti. L'alternative a été l'approche *in silico* : c'est-à-dire l'analyse de 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 et par le nôtre pour aboutir au clonage de trois nouveaux ADNc codant pour les sous-unités α_{1G} , α_{1H} et α_{1I} des canaux T à la fois chez le Rat et chez l'Homme (pour revue, voir Lory *et al.*, 2001 et Perez-Reyes, 2003 ; voir Fig. 3). Les caractéristiques premières d'un courant T ont été retrouvées lorsque ces sous-unités ont été exprimées fonctionnellement dans une cellule receveuse : ovocyte de Xénope ou cellules de mammifères (Fig. 4). Les courants T enregistrés sur des cellules HEK-293 surexprimant les sous-unités recombinantes α_{1G} , α_{1H} et α_{1I} présentent les propriétés suivantes : 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 d'ions Ba^{2+} extracellulaire) d'environ 7 pS (Perez-Reyes *et al.*, 1998 ; Monteil *et al.*, 2000a). Toutefois, la sous-unité α_{1I} génère un courant calcique avec des cinétiques d'activation et d'inactivation 6 à 8 fois plus lentes, comparativement à α_{1G} et α_{1H} (Chemin *et al.*, 2002a). Une autre spécificité des canaux générés par α_{1I} concerne 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 données est qu'il existe une diversité fonctionnelle des canaux T liée à la nature de l'isotype (α_{1G} , α_{1H} et α_{1I}) de la sous-unité canalaire. Par ailleurs, on ne connaît pas à l'heure

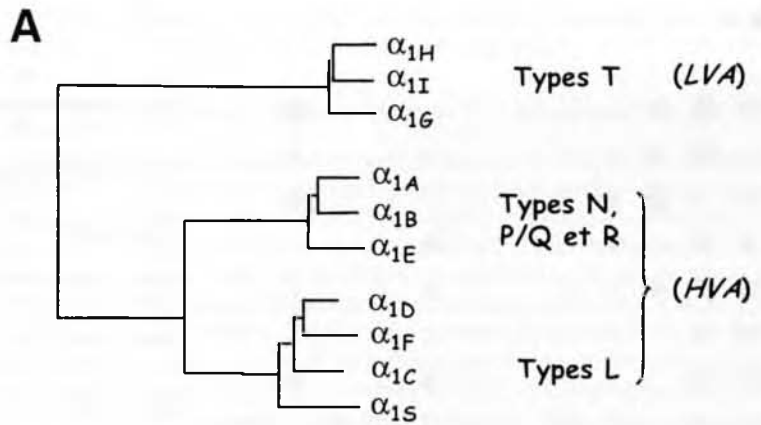


FIG. 3 A – Représentation phylogénétique de l'existence des multiples sous-unités α_1 générant les canaux calciques. B – Tableau récapitulant les dénominations et caractéristiques des gènes et des sous-unités α_1 générant les canaux calciques de type T.

B

Nom de la sous-unité		Nomenclature génique	localisation chromosomique
α_{1G}	$Ca_v3.1$	CACNA1G	17q22
α_{1H}	$Ca_v3.2$	CACNA1H	16p13.3
α_{1I}	$Ca_v3.3$	CACNA1I	22q12.3-13.2

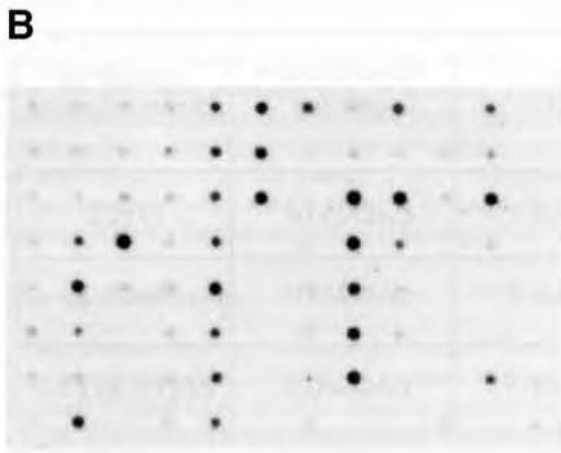
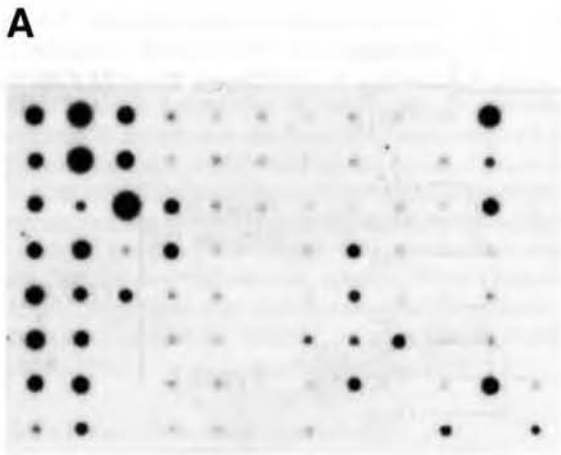
actuelle de sous-unités associées aux sous-unités α_{1G} , α_{1H} et α_{1I} . De telles protéines pourraient engendrer des régulations spécifiques de certains canaux T natifs expliquant certaines caractéristiques fonctionnelles singulières décrites précédemment.

Parallèlement à l'identification des premiers ADNc codant pour α_{1G} , α_{1H} et α_{1I} , les travaux se sont également portés sur la caractérisation des gènes correspondants désignés CACNA1G, CACNA1H et CACNA1I qui sont situés sur les chromosomes humains 17q22, 16p13.3 et 22q12-13, respectivement (Cribbs *et al.*, 1998; Monteil *et al.*, 2000a et b). Dès les premiers travaux de clonage, il est apparu qu'il existait des isoformes (variants d'épissage) pour chacune des sous-unités α_{1G} , α_{1H} et α_{1I} . La caractérisation intron/exon de ces gènes a confirmé qu'il s'agissait bien d'isoformes générées par épissage différentiel, en particulier pour les sous-unités α_{1G} et α_{1I} (Monteil *et al.*, 2000a; Chemin *et al.*, 2001a et b, Gomora *et al.*, 2002). Il est important de noter que les variations de séquence engendrées par l'épissage alternatif se retrouvent au niveau des boucles intracellulaires, suggérant d'éventuelles régulations spécifiques des multiples isoformes des sous-unités α_{1G} , α_{1H} et α_{1I} . De plus,

les nombreuses isoformes de la sous-unité α_{1G} présentent des propriétés électrophysiologiques spécifiques qui rappellent les propriétés des courants T de certains neurones (neurones relais du thalamus, cellules de Purkinje du cervelet). La diversité des courants T sur les cellules natives peut donc s'expliquer à la fois par la nature de l'isotype exprimé (α_{1G} , α_{1H} et α_{1I}) et celle de l'isoforme (Chemin *et al.*, 2001a & 2002a).

CANAUX CALCIFIQUES DE TYPE T ET PROLIFÉRATION CELLULAIRE

Des courants T sont observés sur de très nombreux tissus et l'analyse des transcrits codants pour les sous-unités α_{1G} et α_{1H} a confirmé ces données. Si l'expression de la sous-unité α_{1I} est restreinte essentiellement aux tissus neuronaux (Monteil *et al.*, 2000b), on retrouve les transcrits codant pour les sous-unités α_{1G} et α_{1H} sur de nombreux tissus et lignées cellulaires (Fig. 4). Comme évoqué plus haut, une caractéristique électrophysiologique importante des cellules en phase proliférative est la présence d'un courant T (Chen *et al.*, 1988). Cette obser-



whole brain	cerebellum, left	substantia nigra	heart	esophagus	colca, transverse	kidney	lung	liver	leukemia, HL-60	fetal brain	yeast total RNA
cerebral cortex	cerebellum, right	nucleus accumbens	atria	stomach	colon, descending	skeletal muscle	placenta	pancreas	HeLa S3	fetal heart	yeast tRNA
frontal lobe	corpus callosum	thalamus	atrium, left	duodenum	rectum	spleen	bladder	adrenal gland	leukemia, K-562	fetal kidney	<i>E. coli</i> rRNA
parietal lobe	amygdala	pituitary gland	atrium, right	jejunum		thymus	uterus	thyroid gland	leukemia, MOLT-4	fetal liver	<i>E. coli</i> DNA
occipital lobe	caudate nucleus	spinal cord	ventricle, left	ileum		peripheral blood leukocyte	prostate	salivary gland	Burkitt's lymphoma, Raji	fetal spleen	poly(A)
temporal lobe	hippocampus		ventricle, right	ileocecum		lymph node	testis	mammary gland	Burkitt's lymphoma, Daudi	fetal thymus	human C β 1 DNA
p.o. of cerebral cortex	medulla oblongata		inter-ventricular septum	appendix		bone marrow	ovary		colorectal adenocarcinoma, SW620	fetal lung	human DNA 100 ng
pons	putamen		apex of the heart	colon, ascending		trachea			lung carcinoma, A549		human DNA 500 ng

FIG. 4 – Analyse en dot blot de l'expression des transcrits codant pour les sous-unités α_{IG} et α_{IH} dans les tissus humains (pour les méthodes, voir Monteil *et al.*, 2000a). **A** – Détection des transcrits codant pour la sous-unité α_{IG} . **B** – Détection des transcrits codant pour la sous-unité α_{IH} . **A** – Identification de la position sur la membrane des tissus humains dont l'ARNm a été déposé.

vation a été faite au laboratoire sur des cellules tumorales et sur plusieurs modèles cellulaires de dédifférenciation, les cellules musculaires lisses en particulier (Richard *et al.*, 1992). Sur les cellules musculaires lisses, il a été établi une corrélation étroite entre cycle cellulaire et densité de courant calcique de type T : les canaux T seraient spécifiquement exprimés au moment de la transition G1/S du cycle cellulaire (Kuga *et al.*, 1996). Une observation similaire a été effectuée sur des cardiomyocytes en culture suggérant également un rôle des canaux T dans l'évolution phénotypique des cardiomyocytes (Guo *et al.*, 1998). Néanmoins, on ne sait toujours pas si l'expression des canaux T est la conséquence de l'entrée en phase S ou si l'entrée en phase S induit l'expression de canaux T. On peut également émettre l'hypothèse que ces canaux interviendraient dans une étape précoce de la différenciation qui aurait lieu pendant la fin de la phase S. L'avantage des lignées cellulaires est qu'il est facile de paramétrer les caractéristiques de prolifération/différenciation par la technique

de cytométrie de flux (FACS) combinée à un immunomarquage bromodésoxyuridine (BrdU) permettant d'évaluer la proportion de cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire (voir Chemin *et al.*, 2000). Il est désormais possible de manipuler le niveau d'expression des canaux T dans ces cellules en utilisant des stratégies antisens ou de surexpression d'ADN complémentaires. Dans la lignée cellulaire HEK-293 qui n'exprime pas de canaux T de façon constitutive, nous avons pu mettre en évidence une caractéristique électrophysiologique importante des canaux T qui est l'existence d'un courant de fenêtre : un influx calcique soutenu aux alentours du potentiel de repos des cellules (entre -50 à -70 mV). Cela signifie qu'à ces potentiels de membrane les canaux T génèrent une entrée continue de calcium dans les cellules qui les expriment (Fig. 5). Nous avons démontré l'existence de ce courant de fenêtre en utilisant une technique d'imagerie calcique. La surexpression des canaux T (α_{IG} ou α_{IH}) contribue à une surcharge calcique basale des cellules transfectées

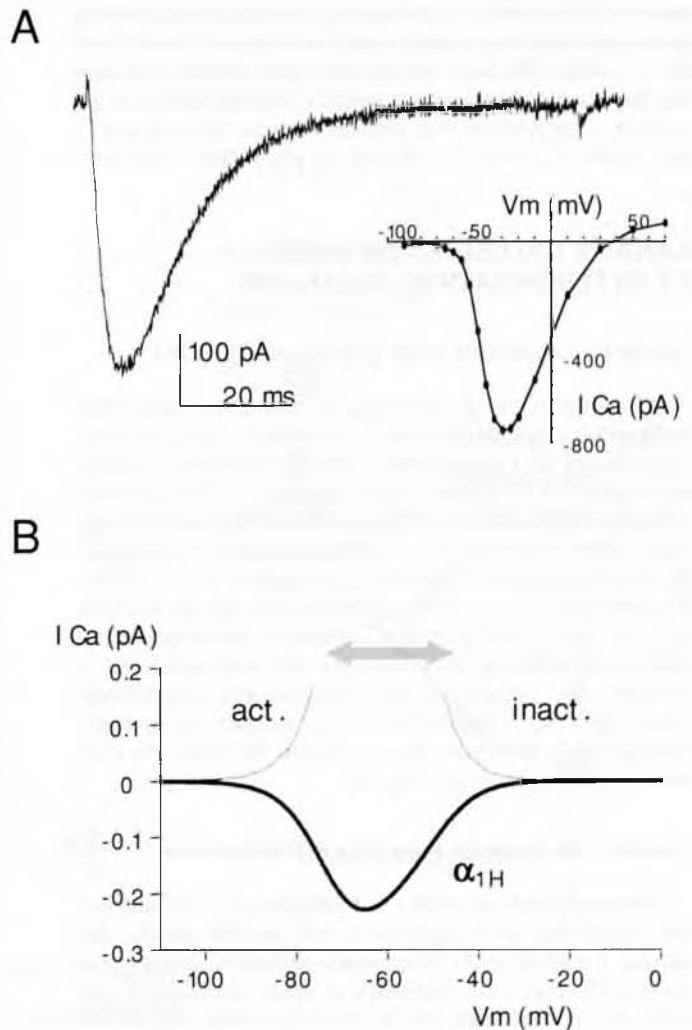
(Chemin *et al.*, 2000). Ce résultat est important puisqu'une augmentation de la concentration basale de calcium peut avoir des conséquences importantes en physiologie et notamment au niveau du cycle cellulaire. Toutefois, la seule surexpression d'une sous-unité α_1 dans ce modèle cellulaire (cellules HEK-293) s'avère insuffisante pour induire un changement significatif des caractéristiques du cycle cellulaire (Chemin *et al.*, 2000). Toutefois, nous avons montré sur un modèle neuronal, le neuroblastome NG108-15 (voir plus loin), que l'inhibition des courants T augmentait significativement la prolifération de ces cellules (Chemin *et al.*, 2002b). Il est donc vraisemblable qu'un effet des canaux T en relation avec le phénotype prolifératif ne s'observe que sur un modèle cellulaire prolifératif « compétent » comme dans le cas des cellules NG108-15 et des cellules vasculaires lisses dédifférenciées décrites plus haut. D'autre part, il a été rapporté que les changements morphologiques associés à la transformation des fibroblastes Swiss 3T3 nécessitent un blocage des canaux T (Strobeck *et al.*, 1999). Ces dernières données suggèrent

que la sur-expression des canaux T pourrait être bénéfique dans le traitement de cancers.

Canaux calciques de type T et physiopathologie

Il existe plusieurs exemples en physiopathologie expérimentale montrant une évolution du niveau d'expression des canaux T. L'hypertrophie cardiaque est associée à une réexpression des courants T (Nuss & Houser, 1993). Une telle réexpression est également retrouvée dans un modèle d'infarctus expérimental chez le Rat (Huang *et al.*, 2000). Toutefois, au niveau de la cellule musculaire lisse vasculaire, on observe une présence des courants de type T qui est la conséquence d'un mécanisme de dédifférenciation en culture mais une telle expression n'est pas retrouvée sur les cellules musculaires lisses vasculaires après angioplastie (Quignard *et al.*, 2001). D'autres données récentes font du gène CACNA1G humain codant pour la sous-unité α_{1G} , un candidat particulier pouvant être impliqué dans certaines formes de cancers. En effet, le groupe d'Issa (Toyota *et al.*, 1999; Toyota *et al.*,

FIG. 5 **A** – Enregistrement de courants calciques sur des cellules HEK-293 transfectées avec l'ADN complémentaire codant pour la sous-unité α_{1H} (potentiel de maintien à -110 mV et pic à -30 mV). La courbe courant-potentiel est représentée en insert. Ces courants possèdent l'ensemble des caractéristiques classiques des courants de type T. **B** - Représentation du courant de fenêtre (courant calcique) enregistré sur les mêmes cellules HEK-293 exprimant la sous-unité α_{1H} . Cette représentation est effectuée d'après les caractéristiques des courbes d'activation (act.) et d'inactivation (inact.) à l'équilibre. La gamme de potentiel de repos des cellules est schématisée par une flèche grise.



2001) a montré que le gène CACNA1G codant pour la sous-unité α_{1G} était inactivé par méthylation d'un îlot CpG situé au niveau de son promoteur dans de nombreuses tumeurs humaines (colo-rectales, gastriques, prostatiques, pancréatiques et de la moelle osseuse dans certaines formes de leucémies). Cette méthylation du gène CACNA1G n'est pas retrouvée sur les tissus sains et semble donc spécifique de ces formes de cancers. Ces résultats suggèrent que CACNA1G serait un gène suppresseur de tumeur qui induirait soit la différenciation, soit l'apoptose et que la surexpression des canaux T pourrait être bénéfique dans le traitement de cancers. Les canaux T, la sous-unité α_{1G} d'après ces travaux, seraient donc importants pour la différenciation de nombreux types cellulaires et pourraient donc être une cible d'intérêt pour le traitement des cancers. Il serait toutefois intéressant d'évaluer si, dans ces lignées, le gène CACNA1H est lui transcrit alors que le gène CACNA1G est inactivé par méthylation. Il convient en effet de rappeler ici que la plupart des lignées cellulaires prolifératives expriment des courants T très sensibles au nickel : un résultat plus en accord avec l'expression de la sous-unité α_{1H} (Lee *et al.*, 1999). Les canaux recombinants générés par la sous-unité α_{1H} sont en effet inhibés par de faibles concentrations de nickel ($IC_{50} \sim 2-10 \mu\text{M}$), alors que ceux générés par la sous-unité α_{1G} sont moins sensibles à l'ion nickel ($IC_{50} \sim 100-200 \mu\text{M}$). A ce stade des études, on peut émettre l'hypothèse que les canaux T codés par la sous-unité α_{1G} auraient un rôle distinct de ceux générés par la sous-unité α_{1H} dans l'évolution du phénotype cellulaire.

CANAUX CALCIQUES DE TYPE T ET DIFFÉRENCIATION CELLULAIRE

Canaux calciques de type T et développement

Il est intéressant de noter que les fenêtres d'apparition du courant calcique de type T se situent à des périodes importantes de l'ontogénèse : période prénatale pour la neurogenèse (Frischknecht & Randall, 1998); période prénatale (E16) de la myogenèse squelettique (Bijlenga *et al.*, 2000; Berthier *et al.*, 2002); et période postnatale du développement cardiaque (Leuranguer *et al.*, 2000). Nos travaux sur les profils d'expression des sous-unités α_{1G} , α_{1H} et α_{1I} sur les tissus humains confirment sur le plan moléculaire qu'au moins une des sous-unités (α_{1G}) présente une régulation développementale importante. Chez l'homme, l'expression d' α_{1G} est particulièrement forte au stade embryonnaire au niveau du cœur, des poumons et des reins (voir Fig. 4).

Canaux calciques de type T et différenciation

Plusieurs études récentes ont indiqué qu'il existait soit une régulation de l'expression, soit un rôle précis, des canaux T lors de la différenciation cellulaire. C'est le cas de la différenciation neuronale d'après les travaux que nous avons effectués sur le neuroblastome NG108-15

(Chemin *et al.*, 2002); la différenciation musculaire, c'est-à-dire la fusion, des myoblastes squelettiques (Bijlenga *et al.*, 2000) et la différenciation neuro-endocrine des cellules LNCaP issues de tissu d'origine prostatique cancéreux (Mariot *et al.*, 2002). Ces trois exemples seront tout particulièrement développés dans les paragraphes suivants car ils illustrent les différentes situations actuellement identifiées reliant canaux T et différenciation. D'une façon globale, ces données indiquent que la balance d'expression des canaux T lors de la transition prolifération/différenciation est un facteur critique dans la plupart des processus de différenciation. Par ailleurs, les cellules de rétinoblastomes Y79 qui expriment des courants T au stade indifférencié, voient ce niveau d'expression se réduire lors de la différenciation (Hirooka *et al.*, 2002). Une réduction de la densité des courants T est également observée lors de la différenciation des motoneurones phréniques, ce qui entraîne une diminution des réponses électriques en rebond typiques de ces neurones au stade embryonnaire (Martin-Caraballo & Greer, 2001).

Canaux calciques de type T et différenciation neuronale

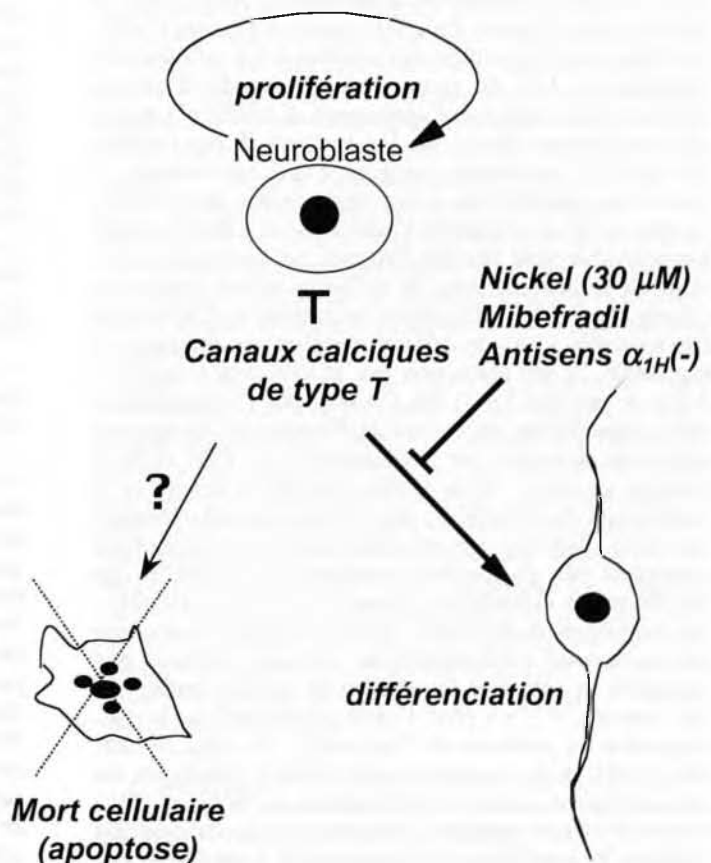
Bien que les entrées de calcium soient cruciales pour la neurogenèse (Gu & Spitzer, 1997; Berridge, 1995; Spitzer *et al.*, 2000), le rôle précis des canaux de type T dans ce processus demeure inconnu. Les canaux T sont pourtant les premiers canaux calciques exprimés sur la plupart des neurones isolés à partir de tissus neuronaux embryonnaires ou au cours des phases précoces de la neurogenèse de diverses structures : ex. cellules du plancher neural, neurones moteurs et sensoriels, neurones hippocampiques (Frischknecht & Randall, 1998). Nous avons utilisé le neuroblastome NG108-15 comme modèle cellulaire de différenciation neuronale pour aborder l'analyse du rôle des canaux T dans la différenciation neuronale. Ces cellules sont utilisées depuis de nombreuses années pour comprendre les mécanismes régissant le passage entre prolifération et différenciation, ainsi que ceux contrôlant la dédifférenciation (Krystosek, 1989). En effet, le cycle cellulaire de ces cellules peut être contrôlé de manière très rapide en jouant sur la concentration du sérum (passage de 10 % à 1 %) combinée à une stimulation pharmacologique : ajout d'AMPc (dibutyryl AMPc), d'acide rétinoïque, de théophylline et/ou de prostaglandine E1. L'état de différenciation des cellules NG108-15 peut être aisément contrôlé en mesurant la neuritogenèse (nombre et longueur des neurites : différenciation morphologique) et en analysant le répertoire des canaux ioniques (différenciation électrophysiologique). Les cellules NG108-15 expriment une forte densité de canaux T, et ce, de manière exclusive à l'état prolifératif (Randall & Tsien, 1997; Leuranguer *et al.*, 1998). En revanche, une fois différenciées, on retrouve les autres canaux ioniques comme les canaux calciques HVA (Lukyanetz, 1998), les canaux potassiques et les canaux sodiques. Une autre lignée qui récapitule les propriétés des neurones cholinergiques centraux : la lignée

SN-56, présente des propriétés similaires aux cellules NG108-15 (Kushmerick *et al.*, 2001).

Nous avons confirmé ces résultats en montrant qu'à l'état prolifératif (cultivées en 10 % sérum), les cellules ne présentent pas de prolongement neuritique et n'expriment que des courants T, mais une fois différenciées (cultivées en présence de 1 % sérum et 1 mM dibutyryl AMPc), les cellules présentent des prolongements neuritiques et expriment des courants calciques HVA (voir Fig. 1). L'apparition des neurites est rapide (significatif après 14 heures), alors que l'expression des courants HVA est plus liée à l'extension neuritique et qu'ils sont majoritairement exprimés après 3 à 5 jours de différenciation. Nous avons identifié sur les cellules différenciées tous les types de courants calciques HVA : N et L principalement, mais aussi des courants de type P/Q et un courant résiduel (type R?) insensible au SNX-482 et à 30 μ M nickel (Chemin *et al.*, 2002). Contrairement aux canaux HVA, la densité des courants T ainsi que leurs propriétés biophysiques et pharmacologiques ne sont pas affectées par la différenciation. Sur les cellules NG108-15, seule la sous-unité α_{1H} est exprimée aussi bien au stade prolifératif qu'au stade différencié. Ainsi, l'utilisation de faibles concentrations de nickel (30 μ M) ou d'antisens spécifiques contre la sous-unité α_{1H} inhibent les courants T (voir Fig. 6). Le fait que 95 % des cellules expriment des courants T avant la neuritogenèse et que l'amplitude des courants HVA soit corrélée à celle

des courants T suggère fortement que les canaux T participent à la différenciation morphologique et électrophysiologique des cellules NG108-15. En utilisant des inhibiteurs des courants T (nickel, mibefradil ou des antisens spécifiques de la sous-unité α_{1H}), nous avons démontré que les courants α_{1H} sont nécessaires à l'apparition des neurites. Cependant, ces stratégies d'inactivation des canaux T n'ont pas d'effet inhibiteur significatif sur la croissance neuritique. Cet effet activateur de la neuritogenèse est dépendant du calcium extracellulaire et intracellulaire puisqu'en présence d'EGTA (un chélateur du calcium extracellulaire) ou de BAPTA-AM (un chélateur du calcium cytosolique) la neuritogenèse est fortement inhibée. De plus, dans ces conditions expérimentales, le nickel n'a plus d'effet. Nous avons également montré que l'inhibition des canaux T altère l'expression de tous les types de canaux calciques HVA (L, N, P/Q et R). Toutefois, les effets sur la neuritogenèse décrits plus haut ne peuvent pas s'expliquer par l'inhibition des canaux HVA puisque les drogues affectant ces derniers (dihydropyridines et toxines spécifiques) n'ont, à elles seules, aucun effet sur la neuritogenèse. Réciproquement, l'inhibition de l'expression des canaux HVA ne peut s'expliquer par l'inhibition de la neuritogenèse puisqu'on note l'absence de courants HVA sur les cellules présentant de longs prolongements dans les cultures traitées avec les inhibiteurs des canaux T. Il semble donc que les courants générés par la sous-unité

FIG. 6 – Représentation schématique de l'implication des canaux calciques de type T dans l'évolution du phénotype des cellules NG108-15. D'une part, l'inhibition des canaux T maintient la prolifération des cellules NG108-15 lorsque celles-ci sont cultivées en milieu différenciant. D'autre part, ces canaux interviennent dans le processus de différenciation. La neuritogenèse est inhibée en présence d'ions nickel (30 μ M) ou de mibefradil (2 μ M) dans le milieu extracellulaire, ou suite à la transfection d'antisens spécifiquement dirigés contre les ARN messagers codant pour la sous-unité α_{1H} .



α_{1H} soient nécessaires à la fois à la différenciation morphologique et électrophysiologique des cellules NG108-15.

Nous avons ensuite recherché par quels mécanismes les canaux T pouvaient participer à la différenciation. Les cellules NG108-15 ont un potentiel de repos autour de $-45/-50$ mV dans les conditions de notre étude, qu'elles soient dans les conditions prolifératives ou cultivées en milieu de différenciation pendant 1 à 5 jours. Nous n'avons toutefois pas enregistré d'activité électrique spontanée. Il semblerait donc que le rôle des canaux T implique le courant de fenêtre. Toutefois, par la technique d'imagerie calcique (Fura-2), nous n'avons retrouvé aucune différence concernant la charge basale ou des variations spontanées de concentration intracellulaire de calcium entre les cellules témoins et les cellules traitées au nickel, aussi bien dans les conditions différenciées ou prolifératives. Nous suggérons donc que les entrées de calcium via le courant de fenêtre puissent être très localisées et proches d'un système de transduction intracellulaire dépendant du calcium. Ainsi une entrée de calcium, même très réduite, enclencherait une cascade activatrice de la différenciation. D'ailleurs, nous avons montré que la création de pores calciques dans ces cellules par l'utilisation d'un ionophore, la ionomycine (250 nM), a peu d'effet sur l'apparition des neurites ($\sim +20\%$) et que, dans ces conditions, l'application de nickel est toujours efficace ($\sim 30\%$ d'inhibition sur la neuritogenèse).

L'effet des canaux T sur la différenciation des cellules NG108-15 dépend de la présence d'AMPC dans le milieu extracellulaire. En effet, le nickel a moins d'effet inhibiteur sur l'apparition des neurites si les cellules sont cultivées en 1 % de sérum sans l'ajout de dibutyryl AMPc. Il faut noter que l'application d'AMPC n'a aucun effet modulateur direct sur les courants T des cellules NG108-15. Ces données suggèrent que ces courants T pourraient moduler des voies dépendantes de l'AMPC, comme celles conduisant à l'activation de CREB (cAMP Response Element Binding Protein), un facteur de transcription important pour la différenciation neuronale (Sheng *et al.*, 1991). En effet, l'activation de CREB peut être modulée 1) par le calcium (pour revue, Berridge *et al.*, 2000), 2) par activation des MAPK (par l'intermédiaire de ras/maf-1), 3) des CAMK (par l'intermédiaire de la calmoduline) ou encore 4) directement en agissant au niveau du noyau, par l'intermédiaire de CBP (CREB binding protein). Nous avons cherché à savoir si la modulation des MAPK ou des CAMK pouvait expliquer les effets observés. Les résultats actuels ne permettent cependant pas de conclure puisque si l'inhibition des MAPK par le PD098059 (10 μ M) et le U0126 (10 μ M) - des inhibiteurs de MAPKK, MEK1 et 2 dont l'activation par les ras/maf-1 est sensible au calcium - entraîne une réduction significative du nombre de cellules présentant des neurites, il n'y a plus d'effet significatif sur la neuritogenèse en présence de l'ion nickel. De plus, un rôle des CAMK dans la neuritogenèse rester à démontrer car leur inhibition suite à l'application de W13 ou W12 (entre 10-70 μ M pendant 12 heures) entraîne la mort des cellules. Il reste donc à déterminer si l'inhibition des

canaux T module l'activation des MAPK, des CAMK ou de CREB dans les cellules NG108-15. Il serait en effet intéressant de confirmer ou d'infirmer un rôle éventuel des canaux T dans la transcription de gènes : un rôle qui, à ce jour, n'est démontré que pour les canaux calciques de type L et P/Q (Dolmetsch *et al.*, 2001 ; Sutton *et al.*, 1999).

Canaux calciques de type T et différenciation musculaire

Le groupe de Laurent Bernheim (Université de Genève) a rapporté des résultats intéressants concernant la différenciation des myoblastes du muscle squelettique (Bijlenga *et al.*, 2000). Dans les muscles squelettiques, la croissance et la régénération des fibres musculaires (passage du stade myoblastes mononucléés au stade myotubes polynucléés) dépendent de la fusion (différenciation) des myoblastes mononucléés obtenus à partir du stock des cellules satellites. En utilisant des cultures clonales de myoblastes humains, Bijlenga *et al.* (2000) ont montré que l'élévation de calcium intracellulaire nécessaire à la fusion est dépendante du courant de fenêtre des canaux T : les canaux calciques majoritairement exprimés sur les myoblastes. Ainsi, les inhibiteurs des canaux T (200 μ M nickel et 100 μ M amiloride) abolissent l'élévation de calcium intracellulaire et la fusion des myoblastes. Dans ce type cellulaire comme dans les cellules NG108-15, ce sont des canaux formés de la sous-unité α_{1H} qui sont impliqués. Ce groupe a montré également que les effets nécessitent l'expression simultanée des canaux potassiques (Kir 2.1) qui entraîne une hyperpolarisation de la cellule (autour de -65 mV) suffisante pour permettre « l'activation » du courant de fenêtre des canaux T (Fischer-Lougheed *et al.*, 2001). En effet, l'inhibition de Kir 2.1 (par l'utilisation d'antisens) entraîne une dépolarisation de la cellule (autour de -30 mV), la « fermeture » du courant de fenêtre des canaux T et l'inhibition de la fusion (Fischer-Lougheed *et al.*, 2001 ; voir également la revue de Bernheim & Bader, 2002).

Canaux calciques de type T et différenciation neuro-endocrine

En utilisant les cellules LNCaP issues de cellules cancéreuses épithéliales de la prostate humaine, Mariot *et al.*, (2002) ont décrit une corrélation entre la présence des canaux T générés par la sous-unité α_{1H} et la différenciation neuro-endocrine induite par l'AMPC. En présence de 1mM dibutyryl AMPc, les cellules LNCaP présentent des prolongements neuritiques et expriment des marqueurs spécifiques des neurones, tels que l'énolase, ainsi que des courants calciques. Contrairement aux cellules NG108-15, les cellules LNCaP prolifératives ne présentent pas de courant T. C'est suite au traitement de ces cellules que l'apparition de courants T et l'expression de la sous-unité α_{1H} se manifestent (sensibilité à l'ion nickel : $IC_{50} = 2,4 \mu$ M). Comme décrit précédemment, les

canaux α_{1H} génèrent un courant de fenêtre induisant une augmentation de calcium intracellulaire. Contrairement à nos résultats, les courants α_{1H} ne semblent pas favoriser l'apparition des neurites, puisque celles-ci sont observables avant même l'augmentation des courants T. Ce courant pourrait intervenir synergiquement dans la pousse neuritique, mais pas dans la synthèse d'énolase. Les auteurs n'ont cependant pas été en mesure de regarder directement l'effet des canaux T sur la neuritogenèse puisque les effets du nickel sont lents (~ 5 jours), alors que la pousse neuritique commence dès 2 heures. Dans ces cellules, il semble donc raisonnable de postuler que les canaux T sont plus importants pour la stabilisation des neurites que pour l'élongation.

Canaux calciques de type T et sécrétion de facteur « différenciant »

De manière intéressante, il semble que, sur les cellules LNCaP, seule une sous-population de cellules (20 % dans les conditions témoins et 60 % après un traitement à l'AMPC) expriment des courants T suggérant le rôle d'un facteur différenciant sécrété par ces cellules et permettant à l'ensemble de la culture de se différencier (Mariot *et al.*, 2002). Dans les cellules LNCaP, il a été montré que la sécrétion de peptides aux propriétés mitogènes est augmentée durant la différenciation neuro-endocrine. Ces auteurs émettent donc l'hypothèse que les canaux T participeraient à la sécrétion de ce(s) facteur(s).

Au niveau des myoblastes, les courants T, comme les élévations de calcium intracellulaire, ne sont retrouvés que dans une sous-population (~ 20 %) de myoblastes (Bijlenga *et al.*, 2000). Une même hypothèse pourrait être que la sécrétion par cette population de cellules d'un facteur de différenciation permette aux autres myoblastes de devenir compétents pour fusionner. Au niveau des cellules NG108-15, des données préliminaires suggèrent également que les cellules sécrèteraient un (des) facteur(s) de différenciation dont la sécrétion serait dépendante des canaux T. L'application de milieu « conditionné » (provenant de cellules NG108-15 différenciées) favorise significativement la neuritogenèse de cellules mises à différencier. La présence d'un tel facteur est réduite dans les milieux issus des cellules cultivées en présence d'ion nickel (50 μ M) ou celles transfectées avec un antisens contre la sous-unité α_{1H} . A l'heure actuelle, nous avons pu montrer que ni l'acétylcholine, ni le glutamate ne jouent ce rôle. Les cellules NG108-15 sont en effet connues pour sécréter ces deux neurotransmetteurs qui ont par ailleurs des effets sur la neuritogenèse. La sécrétion de ce facteur est également indépendante de la présence d'un inhibiteur de la formation des vésicules de sécrétion : la bréfeldine A. En effet, les effets inhibiteurs du nickel sur la différenciation sont conservés en présence du bloc des récepteurs à l'acétylcholine et du glutamate ou de l'inhibition du transport vésiculaire par la bréfeldine A.

Ce facteur pourrait éventuellement être le même que celui identifié sur les myoblastes. En effet, les cellules NG108-15 ont un comportement ressemblant aux moto-

neurones quand elles sont cultivées en présence de myotubes (croissance axonale vers les myotubes, formation de synapses fonctionnelles) et, dans ce cas, la différenciation des myotubes comme des neurones peut être influencée de manière réciproque (Chen *et al.*, 2001). Il pourrait alors s'avérer intéressant de poursuivre l'étude du rôle des canaux T dans la différenciation neuronale sur un modèle de co-culture neurones-cellules musculaires. Pour compléter ces observations récentes, il est intéressant de noter qu'au niveau des myocytes cardiaques en développement, l'expression des canaux T (isotype α_{1G}) est sous la dépendance des hormones GH et IGF₁ (Xu & Best 1992).

CONCLUSIONS

Des données récentes indiquent que les canaux de type T, et particulièrement ceux générés par la sous-unité α_{1H} , sont impliqués dans la différenciation de nombreux types cellulaires. Les canaux formés par la sous-unité α_{1G} pourraient eux jouer un rôle plus déterminant sur le phénotype prolifératif. Pour prolonger les études effectuées jusqu'à présent sur les modèles cellulaires, il est désormais nécessaire d'étudier le rôle de ces canaux dans la différenciation des tissus natifs (*in vivo*) comme au niveau du système nerveux où ces canaux sont particulièrement exprimés, mais aussi au niveau du rein, du foie, du cœur ou des poumons, des tissus où leurs rôles fonctionnels demeurent obscurs. Ces études seront nécessaires pour mieux comprendre le rôle de ces canaux dans la signalisation calcique des tissus en développement, mais également dans le contexte physiopathologique. L'ensemble de ces recherches pourraient déboucher sur le développement d'antagonistes et d'agonistes des canaux T potentiellement d'intérêt thérapeutique. En effet, les voies de couplage entre l'excitabilité et les mécanismes de prolifération/différenciation cellulaires sont encore largement méconnus. Si un certain nombre d'hypothèses proposées ici étaient vérifiées, elles pourraient ouvrir un champ d'investigation nouveau pour l'étude et le traitement des cancers, ainsi que le développement de médicaments « différenciants » ou « anti-prolifératifs » au mécanisme d'action original. L'enjeu de ces recherches est donc considérable en pathologie humaine. En effet, les couplages excitabilité/expression génique et excitabilité/prolifération, mais également le répertoire des canaux impliqués, sont encore largement sous-estimés et mal connus. Les travaux actuels concernant le rôle des canaux T dans l'évolution du phénotype cellulaire et tout particulièrement dans la différenciation cellulaire devraient donc ouvrir un horizon nouveau pour l'étude des mécanismes associant altération de l'homéostasie calcique et dérèglement phénotypique, décrits pour certains cancers.

Remerciements. – Les recherches effectuées dans le cadre de cet article sont soutenues par le CNRS, L'association pour la Recherche contre le Cancer (ARC), la Ligue contre le Cancer, la Fondation pour la Recherche Médicale (FRM) et l'Association

Française contre les Myopathies (AFM). Les auteurs adressent leurs remerciements sincères à Joël Nargeot pour son soutien enthousiaste de ce programme et à Edward Perez-Reyes (University of Virginia) pour l'ADN complémentaire codant pour la sous-unité α_{1H} .

BIBLIOGRAPHIE

- Arnoult C., Kazam I. G., Visconti P. E., Kopf G. S., Villaz M. & Florman H. M., Control of the low voltage-activated calcium channel of mouse sperm by egg ZP3 and by membrane hyperpolarization during capacitation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999, 96, 6757-6762.
- Bean B., Classes of calcium channels in vertebrate cells. *Annu. Rev. Physiol.*, 1989, 51, 367-384.
- Bernheim L. & Bader C. R., Human myoblast differentiation : Ca^{2+} channels are activated by K^+ channels. *News Physiol. Sci.*, 2002, 17, 22-26.
- Berridge M. J., Calcium signalling and cell proliferation. *Bioessays*, 1995, 17, 491-500.
- Berridge M. J., Lipp P. & Bootman M. D., The versatility and universality of calcium signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 2000, 1, 11-21.
- Berthier C., Monteil A., Lory P. & Strube C., Alpha(1H) mRNA in single skeletal muscle fibres accounts for T-type calcium current transient expression during fetal development in mice. *J. Physiol.*, 2002, 539, 681-691.
- Bijlenga P., Liu J. H., Espinos E., Haenggeli C. A., Fischer-Lougheed J., Bader C. R. & Bernheim L., T-type alpha1H Ca^{2+} channels are involved in Ca^{2+} signaling during terminal differentiation (fusion) of human myoblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000, 97, 7627-7632.
- Carbone E. & Lux H. D., A low-voltage-activated, fully inactivating Ca channel in vertebrate sensory neurons. *Nature*, 1984, 310, 501-502.
- Chemin J., Monteil A., Briquaire C., Richard S., Perez-Reyes E., Nargeot J. & Lory P., Overexpression of T-type calcium channels in HEK-293 cells increases intracellular calcium without affecting cellular proliferation. *FEBS Lett.*, 2000, 478, 166-172.
- Chemin J., Monteil A., Bourinet E., Nargeot J. & Lory P., Alternatively spliced α_G ($Ca_v3.1$) intracellular loops promote specific T-type Ca^{2+} channel gating properties. *Biophys. J.*, 2001a, 80, 1238-1250.
- Chemin J., Monteil A., Dubel S., Nargeot J. & Lory P., The α_{11} T-type Ca^{2+} channel exhibits faster gating properties when overexpressed in neuronal cells. *Eur. J. Neurosci.*, 2001b, 14, 1678-1686.
- Chemin J., Monteil A., Perez-Reyes E., Bourinet E., Nargeot J. & Lory P., Specific contribution of human T-type calcium channel isoforms (α_{1G} , α_{1H} and α_{11}) to neuronal excitability. *J. Physiol.*, 2002a, 540, 3-14.
- Chemin J., Nargeot J. & Lory P., Neuronal T-type α_{1H} calcium channels induce neurogenesis and expression of high voltage activated calcium channels. *J. Neurosci.*, 2002b, 22, 6856-6862.
- Chen C. F., Corbley M. J., Roberts T. M. & Hess P., Voltage-sensitive calcium channels in normal and transformed 3T3 fibroblasts. *Science*, 1988, 239, 1024-1026.
- Chen C. F. & Hess P., Mechanism of gating of T-type calcium channels. *J. Gen. Physiol.*, 1990, 96, 603-630.
- Chen X. L., Zhong Z. G., Yokoyama S., Bark C., Meister B., Berggren P. O., Roder J., Higashida H. & Jeromin A., Overexpression of rat neuronal calcium sensor-1 in rodent NG108-15 cells enhances synapse formation and transmission. *J. Physiol.*, 2001, 532, 649-659.
- Cribbs L. L., Lee J. H., Yang J., Satin J., Zhang Y., Daud A., Barclay J., Williamson M. P., Fox M., Rees M. & Perez-Reyes E., Cloning and characterization of alpha1H from human heart, a member of the T-type Ca^{2+} channel gene family. *Circ. Res.*, 1998, 83, 103-109.
- Dolmetsch R. E., Pajvani U., Fife K., Spotts J. M. & Greenberg M. E., Signaling to the nucleus by an L-type calcium channel-calmodulin complex through the MAP kinase pathway. *Science*, 2001, 294, 333-339.
- Fatt P. & Katz B., The electrical properties of crustacean muscle fibers. *J. Physiol. Lond.*, 1953, 120, 171-204.
- Renaud J. F., Functional and molecular characterization of a T-type Ca^{2+} channel during fetal and postnatal rat heart development. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 2002, 34, 533-546.
- Fischer-Lougheed J., Liu J. H., Espinos E., Mordasini D., Bader C. R., Belin D. & Bernheim L., Human myoblast fusion requires expression of functional inward rectifier Kir2.1 channels. *J. Cell. Biol.*, 2001, 153, 677-686.
- Frischknecht F. & Randall A. D., Voltage- and ligand-gated ion channels in floor plate neuroepithelia of the rat. *Neuroscience*, 1998, 85, 1135-1149.
- Gomora J. C., Murbartian J., Arias J. M., Lee J. H. & Perez-Reyes E., Cloning and expression of the human T-type calcium channel Cav3.3 : insights into prepulse facilitation. *Biophys. J.*, 2002, 83, 229-241.
- Gu X. & Spitzer N. C., Breaking the code : regulation of neuronal differentiation by spontaneous calcium transients. *Dev. Neurosci.*, 1997, 19, 33-41.
- Guo W., Kamiya K., Kodama I. & Toyama J., Cell cycle-related changes in the voltage-gated Ca^{2+} currents in cultured newborn rat ventricular myocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 1998, 30, 1095-1103.
- Hagiwara S. & Naka K. I., The initiation of spike potential in barnacle muscle fibers under low intracellular calcium. *J. Gen. Physiol.*, 1964, 48, 141-161.
- Hagiwara S. & Byerly L., Calcium channel. *Annu. Rev. Neurosci.*, 1981, 4, 69-125.
- Hagiwara S., Ozawa S. & Sand O., Voltage clamp analysis of two inward current mechanisms in the egg cell membrane of a starfish. *J. Gen. Physiol.*, 1975, 65, 617-644.
- Hagiwara N., Irisawa H. & Kameyama M., Contribution of two types of calcium currents to the pacemaker potentials of rabbit sino-atrial node cells. *J. Physiol.*, 1988, 395, 233-253.
- Hirooka K., Bertolesi G. E., Kelly M. E., Denovan-Wright E. M., Sun X., Hamid J., Zamponi G. W., Juhasz A. E., Haynes L. W. & Barnes S., T-Type calcium channel alpha1G and alpha1H subunits in human retinoblastoma cells and their loss after differentiation. *J. Neurophysiol.*, 2002, 88, 196-205.
- Huang B., Qin D., Deng L., Boutjdir M. & El-Sherif N., Reexpression of T-type Ca^{2+} channel gene and current in post-infarction remodeled rat left ventricle. *Cardiovasc. Res.*, 2000, 46, 442-449.
- Huguenard J. R., Low-threshold calcium currents in central nervous system neurons. *Annu. Rev. Physiol.*, 1996, 58, 329-348.
- Huser J., Blatter L. A. & Lipsius S. L., Intracellular Ca^{2+} release contributes to automaticity in cat atrial pacemaker cells. *J. Physiol.*, 2000, 524, 415-422.
- Kostyuk P. G., Calcium channels in cellular membranes. *J. Mol. Neurosci.*, 1990, 2, 123-142.
- Kostyuk P. G., Low-voltage activated calcium channels : achievements and problems. *Neuroscience*, 1999, 92, 1157-1163.
- 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, 14-19.

- Kushmerick C., Romano-Silva M. A., Gomez M. V. & Prado M. A., Changes in Ca²⁺ channel expression upon differentiation of SN56 cholinergic cells. *Brain Res.*, 2001, *916*, 199-210.
- Lee J. H., Gomora J. C., Cribbs L. L. & Perez-Reyes E., Nickel block of three cloned T-type calcium channels : low concentrations selectively block alpha1H. *Biophys. J.*, 1999, *77*, 3034-3042.
- Leuranguer V., Bourinet E., Lory P. & Nargeot J., Antisense depletion of b-subunits fails to affect T-type calcium channels properties in a neuroblastoma cell line. *Neuropharmacology*, 1998, *37*, 701-708.
- 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-H2548.
- Llinàs R. & Yarom Y., Electrophysiology of mammalian inferior olivary neurones *in vitro*. Different types of voltage-dependent ionic conductances. *J. Physiol.*, 1981, *315*, 549-567.
- Lory P., Monteil A., Chemin J., Bourinet E. & Nargeot J., Du clonage des canaux calciques de type T à l'étude de leurs rôles physiologiques. *Médecine/Sciences*, 2001, 979-988.
- Lukyanetz E. A., Diversity and properties of calcium channel types in NG108-15 hybrid cells. *Neuroscience*, 1998, *87*, 265-274.
- Mariot P., Vanoverberghe K., Lalevee N., Rossier M. F. & Prevarskaya N., Overexpression of an alpha 1H (Cav3.2) T-type calcium channel during neuroendocrine differentiation of human prostate cancer cells. *J. Biol. Chem.*, 2002, *277*, 10824-10833.
- Martin-Caraballo M. & Greer J. J., Voltage-sensitive calcium currents and their role in regulating phrenic motoneuron electrical excitability during the perinatal period. *J. Neurobiol.*, 2001, *46*, 231-248.
- Monteil A., Chemin J., Bourinet E., Mennessier G., Lory P. & Nargeot J., Molecular and functional properties of the human alpha(1G) subunit that forms T-type calcium channels. *J. Biol. Chem.*, 2000a, *275*, 6090-6100.
- Monteil A., Chemin J., Leuranguer V., Altier C., Mennessier G., Bourinet E., Lory P. & Nargeot J., Specific properties of T-type calcium channels generated by the human alpha1I subunit. *J. Biol. Chem.*, 2000b, *275*, 16530-16535.
- Nilius B., Hess P., Lansman J. B. & Tsien R. W., A novel type of cardiac calcium channel in ventricular cells. *Nature*, 1985, *316*, 443-446.
- Nowycky M. C., Fox A. P. & Tsien R. W., Three types of neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity. *Nature*, 1985, *316*, 440-443.
- Nuss H. B. & Houser S. R., T-type Ca²⁺ current is expressed in hypertrophied adult feline left ventricular myocytes. *Circ. Res.*, 1993, *73*, 777-782.
- Perez-Reyes E., Cribbs L. L., Daud A., Lacerda A. E., Barclay J., Williamson M. P., Fox M., Rees M. & Lee J. H., Molecular characterization of a neuronal low-voltage-activated T-type calcium channel. *Nature*, 1998, *391*, 896-900.
- Perez-Reyes E., Molecular physiology of low-voltage-activated T-type calcium channels. *Physiol. Rev.*, 2003, *83*, 117-161.
- Quignard J. F., Harricane M. C., Menard C., Lory P., Nargeot J., Capron L., Mornet D. & Richard S., Transient down-regulation of L-type Ca²⁺ channel and dystrophin expression after balloon injury in rat aortic cells. *Cardiovasc. Res.*, 2001, *49*, 177-188.
- Randall A. D. & Tsien R. W., Contrasting biophysical and pharmacological properties of T-type and R-type calcium channels. *Neuropharmacol.*, 1997, *36*, 879-893.
- 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.
- Sheng M., Thompson M. A. & Greenberg M. E., CREB : a Ca²⁺-regulated transcription factor phosphorylated by calmodulin-dependent kinases. *Science*, 1991, *252*, 1427-1430.
- Spitzer N. C., Lautermilch N. J., Smith R. D. & Gomez T. M., Coding of neuronal differentiation by calcium transients. *Bioessays*, 2000, *22*, 811-817.
- Strobeck M. W., Okuda M., Yamaguchi H., Schwartz A. & Fukasawa K., Morphological transformation induced by activation of the mitogen- activated protein kinase pathway requires suppression of the T-type Ca²⁺ channel. *J. Biol. Chem.*, 1999, *274*, 15694-15700.
- Sutton K. G., McRory J. E., Guthrie H., Murphy T. H. & Snutch T. P., P/Q-type calcium channels mediate the activity-dependent feedback of syntaxin-1A. *Nature*, 1999, *401*, 800-804.
- Tanabe T., Takeshima H., Mikami A., Flockerzi V., Takahashi H., Kangawa K., Kojima M., Matsuo H., Hirose T. & Numa S., Primary structure of the receptor for calcium channel blockers from skeletal muscle. *Nature*, 1987, *328*, 313-318.
- Toyota M., Ho C., Ohe-Toyota M., Baylin S. B., & Issa J. P., Inactivation of CACNA1G, a T-type calcium channel gene, by aberrant methylation of its 5' CpG island in human tumors. *Cancer Res.*, 1999, *59*, 4535-4541.
- Toyota M., Kopecky K. J., Toyota M. O., Jair K. W., Willman C. L. & Issa J. P., Methylation profiling in acute myeloid leukemia. *Blood*, 2001, *97*, 2823-2829.
- Xu X. & Best P. M., Postnatal changes in T-type calcium current density in rat atrial myocytes. *J. Physiol.*, 1992, *454*, 657-672.