

Rôle de canaux de type L dans la réponse calcique et la production d'interleukine (IL-)4 par les lymphocytes Th2

par Magali Savignac, Bruno Gomès, Bernard Mariamé, Lucette Pelletier

INSERM U563, CHU Purpan, Place du Dr Baylac, Toulouse 31049 Cedex

Reçu le 5 mai 2003

RÉSUMÉ

Les lymphocytes T CD4⁺ sont hétérogènes en termes de fonctions et de production de cytokines. Les lymphocytes Th1 produisent de l'IL-2 et de l'interféron IFN γ , et sont impliqués dans l'élimination des organismes pathogènes intracellulaires. Au contraire, les lymphocytes Th2 produisent de l'IL-4 et de l'IL-5 et contribuent à l'élimination des helminthes. Ces sous-populations peuvent dériver d'un précurseur commun : la présence d'IL-12 et d'anticorps anti-IL-4 promeut la différenciation des lymphocytes Th1 tandis que la présence d'IL-4 et d'anti-

corps anti-IFN γ favorise le développement de lymphocytes Th2. La stimulation du TCR active une protéine kinase C qui contrôle une entrée de calcium via des canaux de type L dans les lymphocytes Th2. La différenciation des lymphocytes Th2 mais pas celle des lymphocytes Th1 s'accompagne de l'expression des canaux L. Enfin, un inhibiteur des canaux L a été utilisé avec succès pour traiter une maladie auto-immune due à une activation exagérée des lymphocytes Th2 chez le Rat.

SUMMARY Role of L type calcium channels in the calcium response and interleukin (IL-4) synthesis by Th2 cells

CD4⁺ T lymphocytes are divided in Th1 cells that produce interferon (IFN) γ and Th2 cells that synthesize IL-4. These subsets may arise from a common precursor : a combination of IL-12 plus anti-IL-4 monoclonal antibody (mAb) drives Th1 cell differentiation while IL-4 plus anti-IFN γ mAb favor Th2 cell development. TCR stimulation activates protein kinase C that controls a calcium entry through L type

calcium channels in Th2 cells. L type calcium channels are induced during Th2 but not Th1 cell differentiation. In addition, L type calcium channel inhibitors may be successfully used in the treatment of an experimental model of Th2 cell-mediated immunopathology. Thus, this signaling pathway that characterizes Th2 cells can be a target for the treatment of Th2 diseases.

INTRODUCTION

Les lymphocytes T CD4⁺ diffèrent par leurs fonctions et leur production de cytokines (Murphy & Reiner, 2002 ; O'Garra, 1998). Les lymphocytes Th1 produisent de l'interféron IFN γ , de l'interleukine IL-2 et du tumor necrosis factor TNF β . Par leur capacité à produire des cytokines pro-inflammatoires, ils jouent un

rôle déterminant dans l'élimination des organismes pathogènes intracellulaires et peuvent être responsables de manifestations auto-immunes. Les lymphocytes Th2 produisent de l'IL-4 qui active les mastocytes et induit la production d'IgE par les lymphocytes B ainsi que de l'IL-5 qui active les éosinophiles. Ces lymphocytes jouent un rôle dans l'élimination des helminthes mais peuvent aussi être impliqués dans des manifestations pathologiques (asthme, urticaire ...).

TABLEAU 1. – Différences entre lymphocytes Th1 et Th2.

	Th1	Th2
Récepteurs aux cytokines :	IL-12	IL-4
Signalisation dépendante de ces cytokines :	Stat 4	Stat 6
Facteurs de transcription :	T-bet	Gata-3, c-maf
Signalisation via le TCR :	connue	mal connue
Réponse calcique :	concentration de base de calcium intracellulaire : Th2 > Th1. augmentation après stimulation <i>via</i> le TCR : Th1 > Th2	

Les lymphocytes Th1 et Th2 diffèrent par l'expression de récepteurs aux chémokines (Syrbe *et al.*, 1999) et aux cytokines (tableau 1). L'IL-12 produite par des cellules dendritiques activées dirige la différenciation des lymphocytes Th1. La voie de signalisation dépendant du récepteur de l'IL-12 recrute et active le facteur de transcription Stat 4 qui joue un rôle capital dans la différenciation des lymphocytes Th1 comme le montrent les résultats obtenus chez les souris invalidées pour stat 4 (Kaplan *et al.*, 1996b). Dans les lymphocytes Th2, l'expression de la chaîne β du récepteur de l'IL-12 est perdue ; par contre, l'IL-4 amplifie sa propre production. Ainsi, des souris dont le gène codant stat 6 (un facteur de transcription dont l'activité est contrôlée par les voies de signalisation associées au récepteur de l'IL-4) est invalidé ont des réponses Th2 très diminuées (Kaplan *et al.*, 1996a). Les lymphocytes Th1 et Th2 expriment des facteurs de transcription différents. GATA-3 et c-maf caractérisent les lymphocytes Th2 et T-bet les lymphocytes Th1 (revu dans (Glimcher & Murphy, 2000)). Ces facteurs interviennent entre autres dans le remodelage de la chromatine (Avni *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2000; Mullen *et al.*, 2002; Mullen *et al.*, 2001), ce qui favorise l'accès aux gènes des cytokines qui seront transcrites.

Les voies de signalisation engagées par la reconnaissance du peptide antigénique par le récepteur T pour l'antigène (TCR) sont aussi vraisemblablement différentes dans les lymphocytes Th1 et Th2 (Balamuth *et al.*, 2001; Boutin *et al.*, 1997; Leitenberg & Bottomly, 1999). Il est couramment admis que l'activation via le TCR s'accompagne de la constitution d'une zone de contact entre le lymphocyte T et la cellule présentatrice de l'antigène avec formation d'une structure appelée synapse immunologique qui va favoriser la transduction du signal. Un des premiers événements suivant l'engagement du TCR est l'activation de protéines tyrosine kinases de la famille src (p56^{lck} et p59^{lyn}) ayant pour conséquence le recrutement et l'activation de ZAP-70. S'ensuit une cascade de phosphorylations (revue dans Mustelin and Tasken, 2002) aboutissant à l'engagement de diverses voies de signalisation en aval : MAP-kinases, PI-3 kinase, phospholipase Cg1. Cette dernière clive le phosphatidylinositol-triphosphate en inositol 3 phosphate (IP-3) et diacylglycérol (DAG). L'IP-3 se fixe à

son récepteur sur la membrane du réticulum et permet la libération du calcium à partir des stocks intracellulaires. S'ensuit une entrée de calcium à partir du milieu extracellulaire par des canaux dépendant des stocks (ou calcium release calcium activated channels dits CRAC). Ces voies ont été bien étudiées dans des lignées cellulaires type Jurkat. Elles ont aussi été observées dans des lymphocytes Th1. Par contre, dans les lymphocytes Th2, les connaissances sur l'activation consécutive à l'engagement du TCR sont plus floues. Ainsi, la tyrosine kinase p56^{lck} ne semble que partiellement impliquée puisqu'une partie de la production d'IL-4 est conservée dans des cellules T transfectées avec un anti-sens de p56^{lck} (al-Ramadi *et al.*, 1996). Plusieurs groupes ont rapporté que les protéines tyrosine kinases p59^{lyn}, ZAP-70 et la phospholipase Cg1 ne sont pas requises pour la synthèse d'IL-4 (Germain & Stefanova, 1999; Singh *et al.*, 1999; Tamura *et al.*, 1995). L'activation des MAP kinases ne semble pas non plus nécessaire alors qu'elle est indispensable pour la production d'IFN γ par les lymphocytes Th1. Il semble même qu'une activation faible de la MAP-kinase ERK soit indispensable pour induire la différenciation des cellules Th2, probablement en modifiant la composition des facteurs de transcription AP-1 (qui sont des homo ou hétérodimères de fos et jun) par rapport à la composition d'AP-1 dans les lymphocytes Th1 (Jorritsma *et al.*, 2003).

La régulation de la réponse calcique est également différente dans les lymphocytes Th1 et Th2 (Gajewski *et al.*, 1994; Sloan-Lancaster *et al.*, 1997). La concentration calcique intracellulaire serait plus élevée dans les lymphocytes Th2 que dans les lymphocytes Th1 (Fanger *et al.*, 2000; Gajewski *et al.*, 1994; Sloan-Lancaster *et al.*, 1997). Par contre, la réponse calcique serait faible voire inexistante en réponse à l'antigène dans les lymphocytes Th2 (Gajewski *et al.*, 1994; Sloan-Lancaster *et al.*, 1997). Les lymphocytes Th2 ont une capacité moindre que les lymphocytes Th1 à extruder le calcium du cytosol, et la densité de canaux potassiques activés par le calcium (K_{Ca}) est plus faible à la surface des lymphocytes Th2 (Fanger *et al.*, 2000). Or l'entrée de calcium tend à dépolariser la membrane et à dissiper le gradient électrique nécessaire à son entrée dans le cytosol; ce processus est contrebalancé par l'activation des canaux K_{Ca} qui, en permettant la sortie d'ions K^+ , tend à hyperpolariser la membrane. Toutefois, d'autres facteurs encore inconnus contribuent à une réponse calcique différente dans les lymphocytes Th2 aux dires mêmes de Fanger *et al.* (2000).

Pourtant le signal calcique est crucial pour enclencher la transcription du gène de l'IL-4 dans les lymphocytes Th2 comme l'attestent les résultats obtenus avec les souris *Itk*^{-/-} (Fowell *et al.*, 1999). *Itk* est une kinase nécessaire à l'activation de la phospholipase Cg1 et les lymphocytes Th2 ne se développent pas chez les souris *Itk*^{-/-}. Ce défaut peut être corrigé en augmentant l'entrée de calcium dans les cellules. De plus, NFAT est un facteur de transcription dont la translocation nucléaire est contrôlée par la calcineurine, une phosphatase

activable par la calmoduline ayant fixé le calcium. La calcineurine déphosphoryle NFAT qui peut alors se localiser dans le noyau et, en association avec un facteur nucléaire AP-1, active des gènes cibles dont le gène de l'IL-4. Le promoteur de ce gène contient 4 sites de fixation pour NFAT dont 1 fixant à la fois NFAT et c-maf (revue dans Glimcher & Murphy, 2000). La famille NFAT comprend plusieurs membres dont NFAT1 qui active le gène de l'IL-4 tandis que NFAT-2 et NFAT-3 auraient un rôle négatif dans l'expression de ce gène puisque des souris dont les gènes codant NFAT-2 et NFAT-3 sont invalidés développent un syndrome Th2 sévère (Ranger *et al.*, 1998).

Depuis plusieurs années, nous nous sommes intéressés à l'étude de la réponse calcique dans les lymphocytes Th2 et nous avons bénéficié d'un modèle expérimental dans lequel les lymphocytes Th2 étaient activés très rapidement et de façon polyclonale.

MODÈLE D'IMMUNOPATHOLOGIE DU À DES LYMPHOCYTES TH2

Les rats Brown-Norway (BN) développent, quand ils reçoivent une injection de sel de métaux lourds (HgCl_2 ou sels d'or) une maladie auto-immune dépendant des lymphocytes Th2 (revue dans Badou *et al.*, 1999) dont les caractéristiques sont indiquées dans le tableau 2. On note une expression très précoce du gène de l'IL-4 dans la rate et les ganglions de rats BN dès le 3^e jour de traitement, soit après une seule injection d' HgCl_2 ou de sels d'or. Le nombre de lymphocytes B et de lymphocytes T CD4⁺ double, et nous avons pu montrer qu' HgCl_2 ou HAuCl_4 augmente la concentration de calcium intracellulaire, *in vitro*, dans la quasi-totalité des lymphocytes T purifiés (Savignac *et al.*, 2001b). La concentration d'IgE et d'IgG1 augmente de façon considérable et de nombreux auto-anticorps (anti-DNA, anti-laminine) sont trouvés dans le sérum. S'y associent une atteinte rénale avec dépôts d'anticorps anti-laminine

TABLEAU 2. – Caractéristiques de la maladie auto-immune induite par HgCl_2 et les sels d'or chez le rat Brown-Norway.

Expression précoce du gène de l'IL-4 *
Activation polyclonale des lymphocytes B et CD4+
Augmentation considérable de la concentration d'IgE et d'IgG1 **
Production d'auto-anticorps dont des anticorps anti-laminine ***
Glomérulopathie auto-immune
Transfert de la maladie par des lymphocytes Th2

* Les rats reçoivent une injection 3 fois par semaine par voie sous-cutanée avec des doses non toxiques d' HgCl_2 ou de sels d'or (HAuCl_4 ou aurothiopropanolsulfonate de sodium = allochrysin®).

** la production de ces deux isotypes dépend d'une aide apportée par les lymphocytes Th2.

*** La laminine est un composant de la membrane basale glomérulaire. Des anticorps anti-laminine sont trouvés déposés dans les glomérules des animaux qui peuvent développer une protéinurie importante.

dans les glomérules et le développement d'une protéinurie. La maladie est transférable par des lymphocytes Th2 reconnaissant les molécules de classe II du complexe majeur d'histocompatibilité qui ont été obtenus à partir d'animaux malades et qui ont été stimulés par des cellules présentatrices de l'antigène de rats BN normaux avant d'être injectés à des rats BN naïfs. Une maladie sévère se développe alors, à condition que les rats receveurs soient déplétés en cellules CD8⁺ (Saoudi *et al.*, 1995).

Un des phénomènes qui a particulièrement retenu notre attention est le fait que l'incubation de lymphocytes T purifiés de rats BN pendant 2 heures en présence d' HgCl_2 ou d' HAuCl_4 suffit à provoquer la transcription du gène de l'IL-4 (Prigent *et al.*, 1995) Ceci est d'autant plus surprenant que l'IL-4 n'est pas une cytokine produite en réponse primaire. Il est admis que cette cytokine est synthétisée par des lymphocytes Th2 déjà différenciés. Nous avons alors tenté d'approcher les mécanismes responsables.

MISE EN ÉVIDENCE DES MÉCANISMES PAR LESQUELS LES SELS DE MÉTAUX LOURDS INDUISENT LA TRANSCRIPTION DU GÈNE DE L'IL-4 DANS DES HYBRIDOMES T

Nous avons choisi comme système modèle des hybridomes T capables de produire de l'IL-4 après stimulation via le TCR. Nous avons montré que les sels de métaux lourds génèrent un signal calcique qui était aboli en déplaçant le milieu extracellulaire en calcium ou en bloquant la protéine kinase C par des inhibiteurs pharmacologiques (Badou *et al.*, 1997). Ce phénomène était très inattendu dans la mesure où il est admis que, dans les lymphocytes T, les voies calciques et dépendantes de la PKC sont branchées en parallèle alors que nos données suggèrent que l'activation de la PKC était requise pour la génération d'une réponse calcique. Dans d'autres types cellulaires, la PKC est capable de réguler l'activité de canaux calciques comme les canaux dépendant du voltage de type L exprimés par les cellules excitables. Ces canaux sont définis comme des canaux calciques dont l'ouverture dépend d'une forte dépolarisation de la membrane (Varadi *et al.*, 1995). La sous-unité α_1 constitue le pore calcique, et son expression dans l'œuf de Xénope suffit à reconstituer la fonction du canal (Mikami *et al.*, 1989). Plusieurs gènes codent les sous-unités α_1 des canaux L, leur expression dépendant du tissu où elles sont exprimées (tableau 3).

Nous avons recherché la présence de ces canaux par PCR en utilisant des amorces consensuelles s'hybridant avec des séquences de la sous-unité α_1 de tous les canaux L. Nous avons alors détecté un produit de la taille attendue. Le clonage et le séquençage des produits de PCR ont montré la coexistence des sous-unités α_1C et α_1D . De plus, ces hybridomes étaient spécifiquement marqués avec de la dihydropyridine fluorescente montrant que ces cellules expriment des récepteurs à la



TABLEAU 3. – Sous-unités α 1 constituant le pore des canaux calciques de type L.

Type	Tissu
α 1C	muscle lisse, cœur, neurones
α 1D	tissu neuro-endocrine (pancréas...)
α 1S	muscle squelettique
α 1F	rétine

dihydropyridine et suggérant que des canaux L pourraient être impliqués dans la régulation de la réponse calcique dans ces lymphocytes (Savignac *et al.*, 2001a). L'étape suivante a été de mettre au point un système de différenciation *in vitro* de lymphocytes Th1 et Th2 pour tester si les lymphocytes Th2 expriment sélectivement des canaux L et quel est leur rôle dans la différenciation et les fonctions effectrices de cette sous-population.

MODÈLE DE DIFFÉRENCIATION DES LYMPHOCYTES TH2 ET TH1

Nous avons utilisé des souris transgéniques exprimant un TCR spécifique du peptide 323-339 de l'ovalbumine (Ova) (Murphy *et al.*, 1990). Nous avons stimulé toutes les semaines les lymphocytes T transgéniques avec des cellules présentatrices de l'antigène exprimant les molécules de classe II du complexe majeur d'histocompatibilité adéquates (H-2^d) en présence du peptide dans des conditions forçant la différenciation en lymphocytes Th1 ou Th2 (Fig. 1), (Openshaw *et al.*, 1995). Au bout de la 3^e stimulation, les lymphocytes Th1 produisent environ 50 ng/ml d'IFN γ et pas d'IL-4 et les lymphocytes Th2 environ 15-20 ng/ml d'IL-4 et moins de 250 pg/ml d'IFN γ .

EXPRESSION SÉLECTIVE DES CANAUX CALCIFIQUES DE TYPE L DANS LES LYMPHOCYTES TH2

Nous avons recherché la présence d'ARNm des canaux L par PCR quantitative (Fig. 2). Seuls les

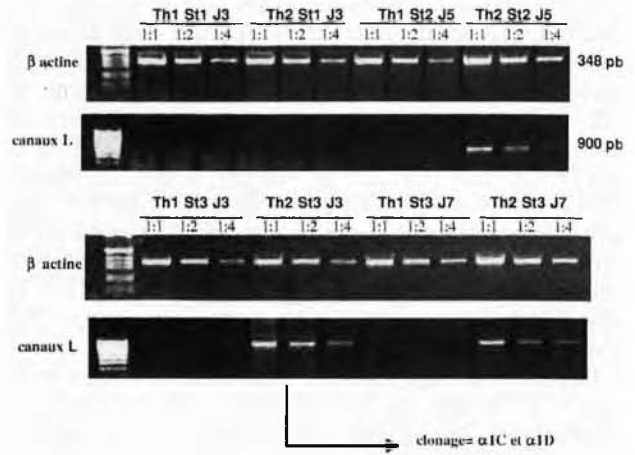


FIG. 2. – Les lymphocytes Th2 expriment sélectivement des canaux calciques L.

Les ARN des lymphocytes Th1 et Th2 sont extraits après 1 ou plusieurs cycles de stimulation (St) à différents jours (J) après la stimulation. Ils sont rétro-transcrits en cDNA. Des dilutions de 2 en 2 sont amplifiées avec des amorces spécifiques de la β actine ou des canaux L. Les produits de PCR ont une taille respective de 348 et 900 paires de bases (pb).

lymphocytes Th2 expriment de l'ARNm pour les canaux L à partir de la 2^e stimulation. Ce marqueur est d'apparition tardive quand on considère que les lymphocytes Th2 expriment le facteur de transcription GATA-3 spécifique des lymphocytes Th2 dès le 3^e jour après la première stimulation par l'antigène. Les lymphocytes Th2, et non pas les lymphocytes Th1, sont marqués avec de la dihydropyridine fluorescente. De plus, ce marquage est supprimé quand les cellules sont pré-incubées avec un excès de dihydropyridine non couplée indiquant que les lymphocytes Th2 expriment des récepteurs pour la dihydropyridine. Un agoniste des canaux L, S(-)-Bay K 8344 abrégé en BK-, induit une augmentation de la concentration de calcium intracellulaire dans les lymphocytes Th2 à partir de la deuxième stimulation et ce phénomène n'est pas retrouvé dans les lymphocytes Th1. Ces données suggèrent que les récepteurs de la dihydropyridine se comportent comme des canaux calciques.

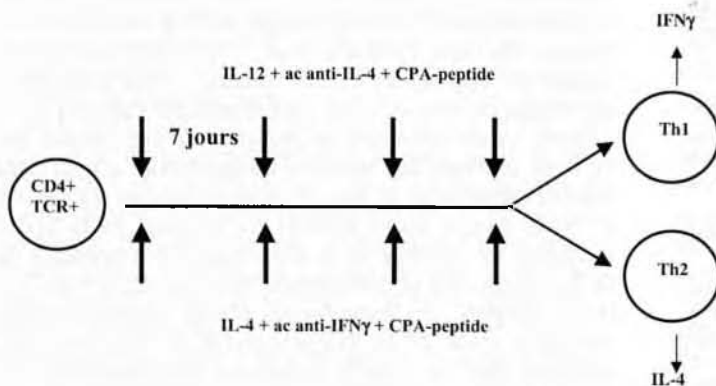


FIG. 1. – Protocole expérimental pour générer des lymphocytes Th1 et Th2.

Les lymphocytes T CD4⁺ exprimant le TCR transgénique pour le peptide 323-339 de l'ovalbumine ont été purifiés et stimulés toutes les semaines en présence de cellules présentatrices de l'antigène (CPA) et du peptide 323-339 de l'ovalbumine dans des « conditions Th1 » (IL-12 5ng/ml, plus anticorps (ac) anti-IL-4 10 μ g/ml) ou Th2 (IL-4 10 ng/ml, et ac anti-IFN γ 10 μ g/ml).

RÔLE DE RÉCEPTEURS À LA DIHYDROPYRIDINE DANS LA DIFFÉRENCIATION ET LES FONCTIONS EFFECTRICES DES LYMPHOCYTES TH2

Un antagoniste des canaux L, R(+)-Bay K 8344 (BK+), a été ajouté lors de la première stimulation des lymphocytes T transgéniques dans des conditions « Th2 ». Chaque fois que le milieu de culture devait être changé, du milieu supplémenté en BK+ était utilisé. Au bout de 7 jours, les cellules ont été lavées et restimulées pendant 24 heures en présence de cellules présentatrices de l'antigène et du peptide antigénique mais sans ajout d'IL-4 et d'ac anti-IFN γ puis l'IL-4 produite a été dosée. Le BK+ ne modifie pas la différenciation des lymphocytes Th2. Par contre, la présence de cet antagoniste des canaux L diminue la production d'IL-4 d'environ 50 % par des lymphocytes Th2. Ceci montre que l'antagoniste n'affecte pas la différenciation des lymphocytes Th2 mais qu'il réduit la production d'IL-4 par des lymphocytes effecteurs. Le BK+ n'a pas d'effet sur la production d'IFN γ par les lymphocytes Th1.

UTILISATION D'INHIBITEURS CALCIQUES DANS UN MODÈLE DE MALADIE DÉPENDANT DE LYMPHOCYTES TH2

Nous avons utilisé le modèle d'immunopathologie induite par injections de sels d'or (Savignac *et al.*, 2001b) pour tester si des antagonistes des canaux L pouvaient en modifier l'évolution. Nous avons d'abord vérifié que l'injection de sels d'or à des rats BN s'accompagne de l'expression des canaux L dans les lymphocytes T spléniques. Nous avons ensuite injecté de la nicardipine (loxen®), 1 mg par rat par voie intrapéritonéale tous les jours et, ou non, l'allochrysin® (le sel d'or utilisé en France dans le traitement de la polyarthrite rhumatoïde). Nous avons choisi le loxen® comme antagoniste des canaux L car il est classiquement utilisé dans le traitement de l'hypertension artérielle chez l'Homme et il est disponible sous forme injectable. Le loxen® a un effet bénéfique avec une réduction de 75 % de l'augmentation de la concentration des IgE par rapport à ce qui est observé chez des rats n'ayant reçu que l'injection de sels d'or. Parallèlement, le loxen supprime totalement la production d'auto-anticorps et l'on ne retrouve plus de dépôts d'immunoglobulines dans les reins. Ces résultats laissent entrevoir la possibilité que des médicaments ciblant les canaux L peuvent être efficaces pour bloquer les fonctions effectrices des lymphocytes Th2.

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Ces travaux montrent que les voies de signalisation dépendant du TCR sont différentes dans des

lymphocytes exerçant des fonctions différentes. Ceci ouvre la possibilité de développer des stratégies en ciblant un maillon d'une voie de signalisation spécifique d'un type de cellules effectrices.

Une question importante qui reste en suspens concerne le mode de fonctionnement des canaux L qui sont connus comme dépendant du voltage alors que les lymphocytes Th2 ne sont pas des cellules excitables. Nous avons induit une dépolarisation de la membrane plasmique des lymphocytes Th2 avec du KCl mais nous n'avons pas observé d'entrée calcique. Ceci montre que l'ouverture des canaux L ne nécessite pas de dépolarisation ou qu'une dépolarisation n'est pas suffisante pour activer le canal. De ce point de vue, il est intéressant de noter qu'une ou des PKC contrôlent l'activation des canaux L.

Dans les lymphocytes B, il a également été rapporté que l'activation du récepteur pour l'antigène induisait une entrée de calcium *via* des canaux calciques L (Sadighi Akha *et al.*, 1996). Les auteurs suggèrent fortement le rôle de la voie NO-GMPc dans ce phénomène. Si cela est vérifié dans les lymphocytes Th2, il est possible que des canaux cationiques sensibles au GMPc soient activés, ce qui entraînerait une dépolarisation (Shaw *et al.*, 1999) favorisant l'ouverture des canaux L (Fig. 3). Une PKC dont l'identité reste à

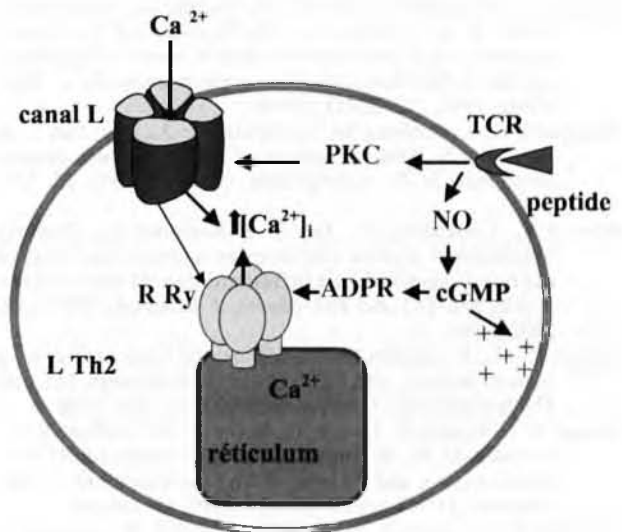


Fig. 3. – Schéma hypothétique intégrant le fonctionnement des canaux L dans les lymphocytes (L) Th2.

La reconnaissance du peptide par le TCR entraînerait l'activation d'une PKC qui phosphorylerait le canal L. Par ailleurs du NO serait généré, ce qui entraînerait l'activation d'une guanylate cyclase. L'apparition de GMP cyclique (GMPc) permettrait l'ouverture de canaux cationiques sensibles au GMPc. S'ensuivrait une dépolarisation de la membrane qui favoriserait l'ouverture des canaux L. Parallèlement, de l'ADP-ribose (ADPR), connu pour activer des récepteurs à la ryanodine (RyR) exprimés sur le réticulum, pourrait être généré. Il existe aussi une possibilité de couplage entre les canaux L et les RyR. La conséquence serait une libération des stocks de calcium intracellulaire. Au total, l'augmentation de concentration de calcium intracellulaire ($[Ca^{2+}]_i$) permettrait la transcription du gène de l'IL-4.



déterminer serait activée suite à l'engagement du TCR et phosphorylerait les canaux (Shistik *et al.*, 1998) conduisant à leur activation. Il sera aussi intéressant d'explorer l'existence d'un couplage entre les canaux L et des récepteurs à la ryanodine comme cela a été décrit dans le muscle squelettique. Savoir si, dans ces conditions, le canal L est un canal calcique ou si son changement de conformation active un canal à la ryanodine sous-jacent est un objet de débat. Pour certains, le canal à la ryanodine serait le vrai médiateur de la réponse calcique. De ce point de vue, il a été montré récemment que des canaux à la ryanodine étaient présents dans les lymphocytes T (Guse *et al.*, 1999).

BIBLIOGRAPHIE

- Al-Ramadi B. K., Nakamura T., Leitenberg D. & Bothwell A. L., Deficient expression of p56(lck) in Th2 cells leads to partial TCR signaling and a dysregulation in lymphokine mRNA levels. *J. Immunol.*, 1996, *157*, 4751-4761.
- Avni O., Lee D., Macian F., Szabo S. J., Glimcher L. H. & Rao A., T(H) cell differentiation is accompanied by dynamic changes in histone acetylation of cytokine genes. *Nat. Immunol.*, 2002, *3*, 643-651.
- Badou A., Saoudi A., Dietrich G., Druet E., Druet P. & Pelletier L., Mercuric chloride-induced autoimmunity. *Curr. Prot. Immunol.*, 1999, *15*, 1-18.
- Badou A., Savignac M., Moreau M., Leclerc C., Pasquier R., Druet P. & Pelletier L., HgCl₂-induced IL-4 gene expression in T cells involves protein kinase C-dependent calcium influx through L-type calcium channels. *J. Biol. Chem.*, 1997, *272*, 32411-32418.
- Balamuth F., Leitenberg D., Unternaehrer J., Mellman I. & Bottomly K., Distinct patterns of membrane microdomain partitioning in Th1 and th2 cells. *Immunity*, 2001, *15*, 729-738.
- Boutin Y., Leitenberg D., Tao X. & Bottomly K., Distinct biochemical signals characterize agonist- and altered peptide ligand-induced differentiation of naive CD4⁺ T cells into Th1 and Th2 subsets. *J. Immunol.*, 1997, *159*, 5802-5809.
- Fanger C. M., & Cahalan M. D., Differential Ca²⁺ influx, KCa channel activity, and Ca²⁺ clearance distinguish Th1 and Th2 lymphocytes. *J. Immunol.*, 2000, *164*, 1153-1160.
- Fowell D. J., Shinkai K., Liao X. C., Beebe A. M., Coffman R. L., Littman D. R. & Locksley R. M., Impaired NFATc translocation and failure of Th2 development in Itk-deficient CD4⁺ T cells. *Immunity*, 1999, *11*, 399-409.
- Gajewski T. F., Lancki D. W., Stack R. & Fitch F. W., « Anergy » of T_H0 helper T lymphocytes induces downregulation of T_H1 characteristics and a transition to a T_H2-like phenotype. *J. Exp. Med.*, 1994, *179*, 481-491.
- Germain R. N. & Stefanova I., The dynamics of T cell receptor signaling: complex orchestration and the key roles of tempo and cooperation. *Annu. Rev. Immunol.*, 1999, *17*, 467-522.
- Glimcher L. H. & Murphy K. M., Lineage commitment in the immune system: the T helper lymphocyte grows up. *Genes Dev.*, 2000, *14*, 1693-1711.
- Guse A. H., Da Silva C. P., Berg I., Skapenko A. L., Weber K., Heyer P., Hohenegger M., Ashamu G. A., Schulze-Koops H., Potter B. V. & Mayr G. W., Regulation of calcium signalling in T lymphocytes by the second messenger cyclic ADP-ribose. *Nature*, 1999, *398*, 70-73.
- Jorritsma P. J., Brogdon J. L. & Bottomly K., Role of TCR-Induced Extracellular Signal-Regulated Kinase Activation in the Regulation of Early IL-4 Expression in Naive CD4(+) T Cells. *J. Immunol.*, 2003, *170*, 2427-2434.
- Kaplan M. H., Schindler U., Smiley S. T. & Grusby M. J., Stat6 is required for mediating responses to IL-4 and for the development of Th2 cells. *Immunity*, 1996a, *4*, 313-319.
- Kaplan M. H., Sun Y. L., Hoey T. & Grusby M. J., Impaired IL-12 responses and enhanced development of Th2 cells in Stat4-deficient mice. *Nature*, 1996b, *382*, 174-177.
- Lee H. J., Takemoto N., Kurata H., Kamogawa Y., Miyatake S., O'Garra A. & Arai N., GATA-3 induces T helper cell type 2 (Th2) cytokine expression and chromatin remodeling in committed Th1 cells. *J. Exp. Med.*, 2000, *192*, 105-115.
- Leitenberg D. & Bottomly K., Regulation of naive T cell differentiation by varying the potency of TCR signal transduction. *Semin. Immunol.*, 1999, *11*, 283-292.
- Mikami A., Imoto K., Tanabe T., Niidome T., Mori Y., Takeshima H., Narumiya S. & Numa S., Primary structure and functional expression of the cardiac dihydropyridine sensitive calcium channel. *Nature*, 1989, *340*, 230-233.
- Mullen A. C., Hutchins A. S., High F. A., Lee H. W., Sykes K. J., Chodosh L. A. & Reiner S. L., Hlx is induced by and genetically interacts with T-bet to promote heritable T(H) gene induction. *Nat. Immunol.*, 2002, *3*, 652-658.
- Mullen A. C., Hutchins A. S., Villarino A. V., Lee H. W., High F. A., Cereb N., Yang S. Y., Hua X. & Reiner S. L., Cell cycle controlling the silencing and functioning of mammalian activators. *Curr. Biol.*, 2001, *11*, 1695-1699.
- Murphy K. M., Heimberger A. B. & Loh D. Y., Induction by antigen of intrathymic apoptosis of CD4⁺CD8⁺ TCR⁺ thymocytes *in vivo*. *Science*, 1990, *250*, 1720-1723.
- Murphy K. M. & Reiner S. L., The lineage decisions of helper T cells. *Nat. Rev. Immunol.*, 2002, *2*, 933-944.
- Mustelin T. & Tasken K., Positive and negative regulation of T cell activation through kinases and phosphatases. *Biochem. J.*, 2002, *16*.
- O'Garra A., Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets. *Immunity*, 1998, *8*, 275-283.
- Openshaw P., Murphy E. E., Hosken N. A., Maino V., Davis K., Murphy K. & O'Garra A., Heterogeneity of intracellular cytokine synthesis at the single-cell level in polarized Th1 and Th2 populations. *J. Exp. Med.*, 1995, *182*, 1357-1367.
- Prigent P., Saoudi A., Pannetier C., Graber P., Bonnefoy Y., Druet P. & Hirsch F., Mercuric chloride, a chemical responsible for Th2-mediated autoimmunity in Brown Norway rats, directly triggers T cells to produce IL-4. *J. Clin. Invest.*, 1995, *96*, 1484-1489.
- Ranger A. M., Oukka M., Rengarajan J. & Glimcher L. H., Inhibitory function of two NFAT family members in lymphoid homeostasis and Th2 development. *Immunity*, 1998, *9*, 627-635.
- Sadighi Akha A. A., Willmott N. J., Brickley K., Dolphin A. C., Galione A. & Hunt S. V., Anti-Ig-induced calcium influx in rat B lymphocytes mediated by cGMP through a dihydropyridine-sensitive channel. *J. Biol. Chem.*, 1996, *271*, 7297-7300.
- Saoudi A., Castedo M., Nochy D., Mandet C., Pasquier R., Druet P. & Pelletier L., Self reactive anti-class II Th2 cell lines derived from gold salt-injected rats trigger B cell polyclonal activation and transfer autoimmunity in CD8-depleted normal syngeneic recipients. *Eur. J. Immunol.*, 1995, *25*, 1972-1979.
- Savignac M., Badou A., Moreau M., Leclerc C., Guery J. C., Paulet P., Druet P., Ragab-Thomas J. & Pelletier L., Protein kinase C-mediated calcium entry dependent upon dihydropyridine sensitive channels: a T cell receptor coupled signaling pathway involved in IL-4 synthesis. *Faseb. J.*, 2001a, *15*, 1577-1579.

- Savignac M., Badou B., Delmas C., Subra J. F., De Cramer S., Paulet P., Cassar G., Druet P., Saoudi A. & Pelletier L., Gold is a T cell polyclonal activator in BN and LEW rats but favors IL-4 expression only in autoimmune prone BN rats. *Eur. J. Immunol.*, 2001b, *31*, 2266-2276.
- Shaw P. J., Charles S. L. & Salt T. E., Actions of 8-bromo-cyclic-GMP on neurones in the rat thalamus *in vivo* and *in vitro*. *Brain Res.*, 1999, *833*, 272-277.
- Shistik E., Ivanina T., Blumenstein Y. & Dascal N., Crucial role of N terminus in function of cardiac L-type Ca²⁺ channel and its modulation by protein kinase C. *J. Biol. Chem.*, 1998, *273*, 17901-17909.
- Singh R. A., Zang Y. C., Shrivastava A., Hong J., Wang G. T., Li S., Tejada-Simon M. V., Kozovska M., V.M., R. & Zhang J. Z., Th1 and Th2 deviation of myelin-autoreactive T cells by altered peptide ligands is associated with reciprocal regulation of Lck, Fyn, and ZAP-70. *J. Immunol.*, 1999, *163*, 6393-6402.
- Sloan-Lancaster J., Steinberg T. H. & Allen P. M., Selective loss of the calcium ion signaling pathway in T cells maturing toward a T helper 2 phenotype. *J. Immunol.*, 1997, *159*, 1160-1168.
- Syrbe U., Siveke J. & Hamann A., Th1/Th2 subsets: distinct differences in homing and chemokine receptor expression? *Springer Semin. Immunopathol.*, 1999, *21*, 263-285.
- Tamura T., Nakano H., Nagase H., Morokata T., Igarashi O., Oshimi Y., Miyazaki S. & Nariuchi H., Early activation signal transduction pathways of Th1 and Th2 cell clones stimulated with anti-CD3. Roles of protein tyrosine kinases in the signal for IL-2 and IL-4 production. *J. Immunol.*, 1995, *155*, 4692-4701.
- Varadi G., Mori Y., Mikala G. & Schwartz A., Molecular determinants of Ca²⁺ channel function and drug action. *Trends Pharmacol. Sci.*, 1995, *16*, 43-49.