



Disponible en ligne sur
ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France
EM|consulte
www.em-consulte.com

REVUE FRANÇAISE
D'**Allergologie**

Revue française d'allergologie xxx (2014) xxx–xxx

Revue générale

La singularité de la signalisation calcique dans les lymphocytes : possibles implications thérapeutiques dans l'allergie

Singularities of calcium signaling in lymphocytes: Possible implication in the treatment of allergic diseases

L. Pelletier^{a,*,b,c}, N. Rosa^{a,b,c}, M. Savignac^{a,b,c}

^a U1043, Inserm, bâtiment A, CHU Purpan, BP 3028, 31024 Toulouse cedex 3, France

^b CNRS, U5282, 31300 Toulouse, France

^c UPS, Centre de physiopathologie de Toulouse Purpan (CPTP), université de Toulouse, 31300 Toulouse, France

Reçu le 10 avril 2014 ; accepté le 30 juin 2014

Résumé

Les lymphocytes T effecteurs incluent les lymphocytes Th1, Th2, Th17... qui produisent des cytokines et ont des fonctions différentes. Les Th2 producteurs d'(IL)-4, 5 et 13 permettent l'élimination des parasites, mais peuvent causer l'asthme allergique. Mise à part l'immunothérapie qui n'est pas généralisée, les traitements de l'asthme sont symptomatiques et de nouvelles pistes thérapeutiques sont indispensables. La concentration de calcium intracellulaire ([Ca]_i) est étroitement régulée dans les lymphocytes. Les variations de la [Ca]_i contrôlent la majorité des fonctions lymphocytaires. Pourtant cette régulation diffère selon le type de lymphocytes rendant imaginable de cibler une sous-population de lymphocytes impliquée dans une pathologie donnée. Les canaux calciques qui font entrer le Ca²⁺ dans la cellule sont des acteurs importants de la régulation de la [Ca]_i comprenant classiquement les canaux ORAI1 mais aussi les canaux Ca_v1 (v pour dépendant du voltage) codés par 4 gènes de Ca_v1.1 à Ca_v1.4. Les canaux Ca_v1.2 et à un moindre degré Ca_v1.3 sont exprimés par les Th2 murins. L'inhibition de l'une ou l'autre de ces isoformes réduit considérablement le signal calcique et la production de cytokines par ces lymphocytes. Un mélange d'oligonucléotides anti-sens ciblant chacune de ces isoformes prévient l'asthme expérimental. Nous avons aussi montré la sélectivité d'expression de Ca_v1.2 dans les lymphocytes Th2 humains obtenus à partir de donneurs de sang. Notre but est maintenant de déterminer le niveau d'expression des canaux Ca_v1 dans les lymphocytes de sujets asthmatiques et de déterminer si ces canaux sont détectables dans les cellules inflammatoires chez les sujets asthmatiques, ce qui en ferait une cible thérapeutique intéressante dans l'asthme. Un autre objectif est d'identifier la voie de signalisation impliquant les canaux Ca_v1, ce qui pourrait nous permettre de pointer des molécules-clés les plus sélectives possibles des Th2 dans une optique thérapeutique.

© 2014 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Mots clés : Asthme allergique ; Calcium ; Canaux calciques dépendant du voltage Ca_v1 ; Ca_v1.2 ; Lymphocyte Th2 ; Interleukines 4, 5 et 13 ; Protéine kinase C

Abstract

Effector T lymphocytes include Th1, Th2, Th17 lymphocytes producing different sets of cytokines and exert specialized functions. Th2-cells produce interleukin (IL)-4, 5 and 13 contributing to the elimination of parasites, but they can cause allergic asthma. Except immunotherapy, treatments for asthma are symptomatic and novel strategies are needed. Intracellular calcium concentration ([Ca]_i) is tightly regulated in lymphocytes and [Ca]_i variations control almost lymphocyte functions. However, this regulation differs depending upon the lymphocyte subset, suggesting the possibility to selectively target a population of lymphocytes responsible for a given disease. Calcium channels at the cell membrane are responsible for calcium entry from the external medium in the cell. ORAI channels are classically described in T-lymphocytes but other calcium channels as Ca_v1 channels contribute to calcium signaling in T-lymphocytes. Four genes (from Ca_v1.1 to Ca_v1.4) encode Ca_v1 channels. We showed that Ca_v1.2 and at a lesser degree Ca_v1.3 channels are selectively expressed by murine Th2 cells and the inhibition of each or the other isoform strongly

* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : Lucette.Pelletier@inserm.fr (L. Pelletier).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.reval.2014.06.002>

1877-0320/© 2014 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

reduced the calcium response and their cytokine production. In addition, a mix of antisense oligonucleotides specific for $Ca_v1.2$ and $Ca_v1.3$ protects mice against experimental asthma. We also showed that $Ca_v1.2$ was selectively expressed in human Th2 isolated from blood donors. We now aim to determine the level of Ca_v1 expression in lymphocytes of asthmatic patients and to assess if these channels are expressed in lung inflammatory cell. Another objective concerns the identification of key-molecules selectively implicated in Th2 calcium signaling, which could pinpoint novel targets in the treatment of allergic diseases.

© 2014 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Keywords: Allergic asthma; Calcium; Voltage-dependent calcium channels Ca_v1 ; $Ca_v1.2$; Th2 lymphocyte Th2; Interleukins 4, 5 and 13; Protein kinase C

1. Les sous-populations de lymphocytes T effecteurs

Les lymphocytes T effecteurs regroupent plusieurs sous-populations Th1, Th2, Th17, Th9, Th22 et T régulateurs (Treg) [1–5] caractérisés par des facteurs de transcription dits spécifiques de lignage car leur expression suffit à conférer les caractéristiques fonctionnelles de la sous-population. Ces populations productrices de cytokines différentes ont des fonctions distinctes (Fig. 1). Les Th1 producteurs d'interféron gamma ($IFN\gamma$) jouent un rôle important dans les réponses antivirales. Les Th2 producteurs d'interleukine (IL)-4, IL-5 et IL-13 sont spécialisés dans la réponse antiparasitaire en particulier contre les helminthes. Les Th17 producteurs d'IL-17, d'IL-21 et d'IL-22 sont impliqués dans la défense anti-infectieuse en particulier de par leur capacité à activer les neutrophiles. Les Th22 pourraient représenter une sous-population distincte car au moins certains clones sécrètent exclusivement de l'IL-22. Ils ont un fort tropisme pour la peau et seraient importants dans la pathogénie du psoriasis. Les Th9 producteurs d'IL-9 pourraient représenter un stade terminal de différenciation des Th2 ou être un lignage indépendant. Les *follicular helper* (TFH) sont spécialisés dans l'aide aux lymphocytes B, promouvant une production d'anticorps de forte affinité. De façon importante, des lymphocytes T régulateurs naturels et/ou induits en périphérie exprimant le facteur de transcription FOXP3 contribuent à contrôler la réponse immune limitant la survenue de pathologies auto-immunes et allergiques.

Les sous-populations de T effecteurs peuvent causer des pathologies différentes. Les Th1 et Th17 peuvent être associées au développement de maladies auto-immunes tandis que les Th2 sont responsables de pathologies allergiques en particulier chez des sujets atopiques présentant une concentration élevée d'immunoglobulines de type E (IgE). Il est pourtant clair que d'autres populations comme les Th17 contribuent aux asthmes sévères ce qui pourrait expliquer la présence de neutrophiles en particulier dans les asthmes sévères chez l'homme.

2. L'asthme : les cellules en cause

L'asthme est une maladie pulmonaire chronique définie cliniquement qui recouvre plusieurs entités [6]. Dans 50 % des cas, une réponse immunitaire associée à la production des interleukines (IL) de type 2 (IL-4, IL-5 et IL-13) est retrouvée en particulier dans l'asthme allergique. L'asthme allergique qui est majoritaire chez l'enfant est causé par une réponse immunitaire inappropriée contre un antigène dit allergène [7]. Au plan

histologique, la paroi des bronches et bronchioles des asthmatiques apparaît épaissie avec une hypertrophie de la couche musculaire lisse, une hyperplasie des cellules à mucus et un infiltrat péri-bronchique et péri-vasculaire constitué essentiellement d'éosinophiles et de lymphocytes. À la fois, la réponse immune innée et adaptative sont susceptibles d'induire une inflammation de type 2, associée à la présence d'éosinophiles, de mastocytes et de basophiles [8]. Les cellules innées de type 2 (ILC2) ont été mises en évidence dans les années 2010 [9], en particulier chez les souris exprimant un gène rapporteur fluorescent GFP dans toutes leurs cellules productrices d'IL-13. Leur nombre augmente après administration d'IL-33 ou d'IL-25. Ces cellules n'expriment pas de marqueur d'autre lignage (T, B, NK...). Initialement, il a été montré que ces cellules qui produisent de l'IL-5 et de l'IL-13 jouaient un rôle important et précoce dans l'expulsion des œufs de parasites. La présence de ces cellules a été aussi démontrée dans les poumons de souris et des humains [10]. Les allergènes ont souvent une activité de protéase. Ces protéases peuvent activer des récepteurs (PAR) à la surface des épithéliums bronchiques, conduisant à la production de cytokines comme TSLP, l'IL-33 et l'IL-25. Ces deux dernières favoriseraient la prolifération et le recrutement des ILC2 dans les poumons d'asthmatiques. De plus, il a clairement été montré que ces cellules peuvent à elles seules induire une inflammation typique de l'asthme chez des souris dépourvues de lymphocytes T et B en réponse à des champignons type *Alternaria* [11].

Les ILC2 activées produisent de l'IL-5 et de l'IL-13 mais pas d'IL-4, en tout cas en réponse à l'IL-33 ou l'IL-25. Le rôle de ces cellules de la réponse immune innée dans la différenciation des lymphocytes T de type 2 (Th2) n'est pas démontré puisque l'IL-4 est la cytokine-clé dans la différenciation de ces lymphocytes T effecteurs. Il a toutefois été montré récemment que les ILC2 pouvaient être impliquées dans la génération de lymphocytes Th2 en cas d'immunisation par voie aérienne ce qui n'est pas le cas quand la réponse Th2 est induite par immunisation systémique [12].

Il est vraisemblable qu'au cours de l'asthme, les cellules dendritiques présentes dans les poumons instruisent les lymphocytes T biaisant vers la différenciation en lymphocytes Th2 (Fig. 2), [13]. De ce point de vue, TSLP, l'IL-33 et l'IL-25 pourraient être des candidats de choix pour influencer la différenciation en Th2 [10]. TSLP initialement décrit dans les cellules épithéliales thymiques permet l'expression du ligand d'OX40 (OX40L) à la surface des cellules dendritiques qui en interagissant avec les lymphocytes T spécifiques de l'allergène favoriserait leur

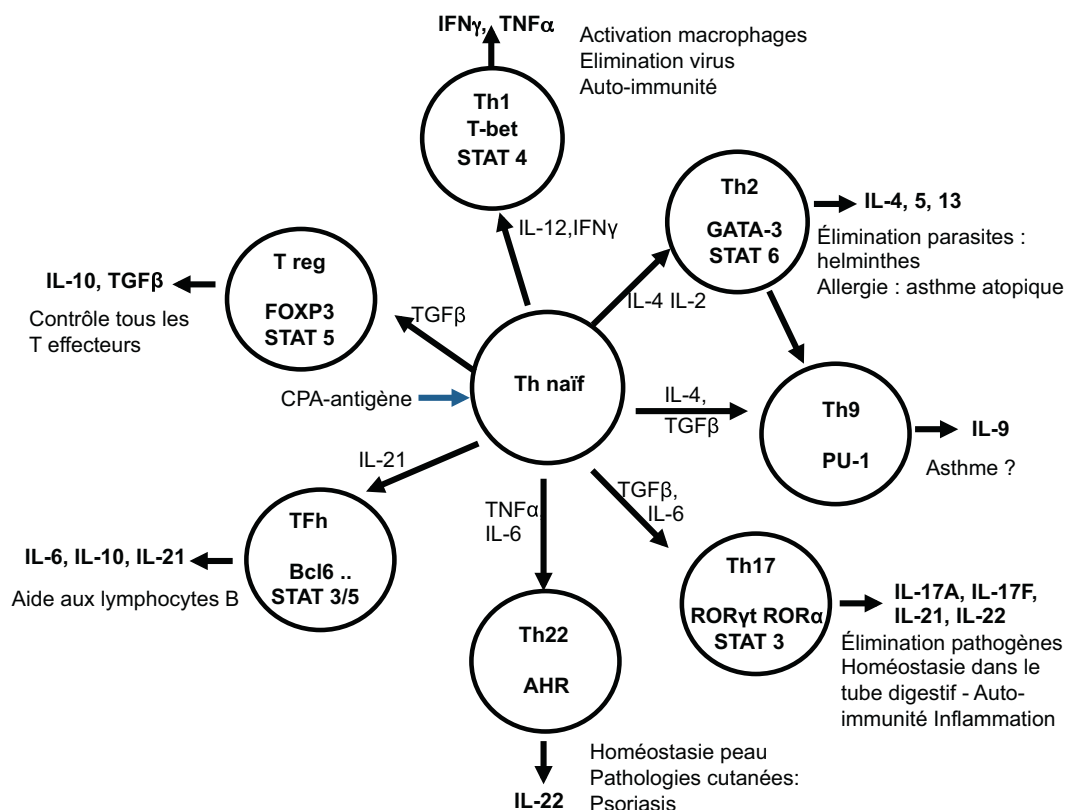


Fig. 1. Sous-populations de lymphocytes T. Un lymphocyte T CD4+ naïf (Thp) peut donner naissance à plusieurs sous-populations de lymphocytes T effecteurs ou à des lymphocytes T régulateurs (T reg) après stimulation par l'antigène selon l'environnement en cytokines dans lequel les lymphocytes T se développent. Nous avons indiqué les cytokines favorisant le développement de ces populations ainsi que les facteurs de transcription qui les caractérisent.

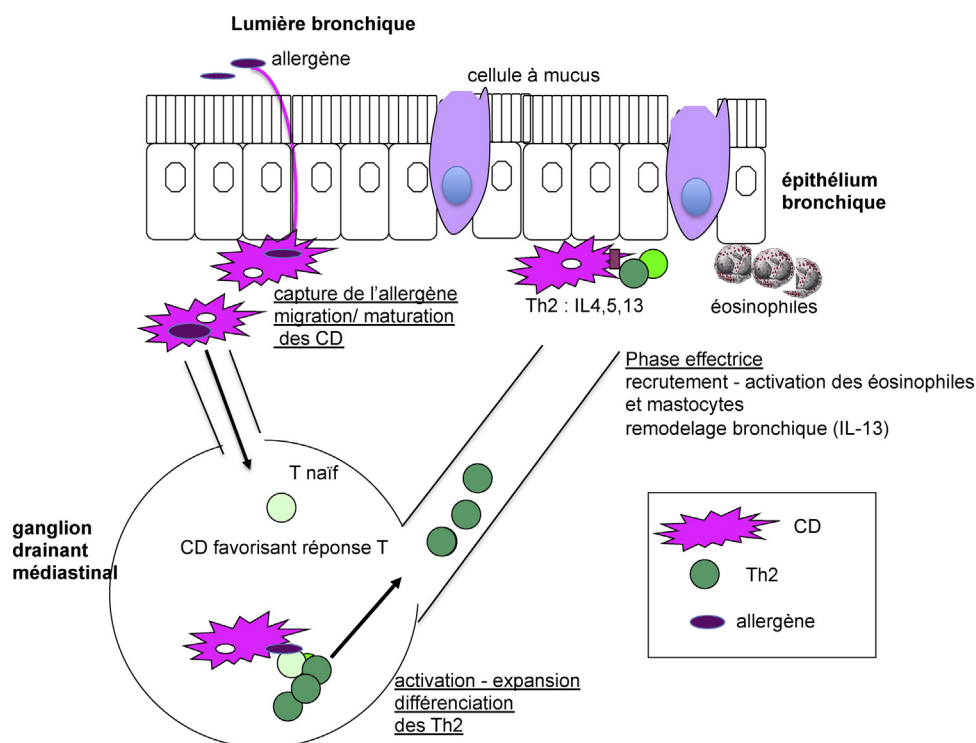


Fig. 2. Schéma du développement de l'asthme allergique. Un allergène est capté dans la lumière bronchique par le prolongement d'une cellule dendritique (CD). La cellule dendritique va maturer, acquérir un programme pro-Th2 (sous l'influence de l'allergène, de cytokines comme TSLP...) et migrer dans le ganglion drainant où elle va activer les lymphocytes T spécifiques du peptide allergénique. Ces lymphocytes T différenciés en Th2 vont migrer dans le tissu pulmonaire où ils vont promouvoir une réaction inflammatoire typique de l'asthme.

différenciation en LTh2. L'expression du facteur de transcription IRF4 dans les cellules dendritiques est nécessaire à la génération de lymphocytes Th2 et d'une inflammation similaire à celle qui caractérise l'asthme. IRF4 contrôlerait l'expression et la production d'IL-10 et d'IL-33 par les cellules dendritiques ce qui serait indispensable au développement des LTh2. Par contre, en absence d'IRF4 dans les cellules dendritiques le développement des lymphocytes Th1 est normal et une inflammation pulmonaire due à ces lymphocytes peut se constituer par exemple dans le cadre d'une infection par le virus de l'influenza [14]. Il n'est pas clair si une sous-population de cellules dendritiques est spécialisée dans la présentation de l'antigène et la génération de lymphocytes Th2 ou si IRF4 par exemple est préférentiellement induit dans une sous-population spécialisée de cellules dendritiques. Il sera également important de comprendre ce qui contrôle l'expression d'IRF4 et quelle est l'implication d'autres types cellulaires comme les cellules épithéliales. Il semble toutefois que *house dust mite* (HDM), un extrait d'acariens puisse agir directement sur les cellules dendritiques pour leur faire exprimer IRF4. Les cellules dendritiques ayant capté l'allergène migrent dans les ganglions lymphatiques drainant les poumons où elles vont permettre la différenciation de lymphocytes CD4+ naïfs en lymphocytes Th2 caractérisés par l'expression du facteur de transcription spécifique de lignage Th2 GATA-3 [15]. GATA-3 est nécessaire pour le maintien de l'identité des lymphocytes Th2 et pour assurer la production des cytokines caractéristiques de ces lymphocytes : l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-13. L'expression stable et soutenue de GATA-3 dans les lymphocytes Th2 requiert à la fois l'engagement du récepteur T pour l'antigène (TCR) suite à la reconnaissance du peptide antigénique associé aux molécules de classe II du complexe majeur d'histocompatibilité et à la voie de signalisation activée par la fixation de l'IL-4 sur son récepteur, voie dépendante du facteur (STAT-6). Dans ces lymphocytes, des modifications épigénétiques vont fixer l'accessibilité de la chromatine au niveau du gène codant l'IL-4 [16].

Les lymphocytes Th2 activés quittent les ganglions lymphatiques, expriment des récepteurs aux chimiokines dont CCR4 qui est requis pour l'entrée dans les poumons. Une fraction des lymphocytes Th2 exprime le récepteur à la chimiokine CX3CL1, CX3CR1 ce qui favorise la survie des lymphocytes Th2 dans les poumons au cours de la réaction inflammatoire dans un modèle d'asthme expérimental [17]. Les lymphocytes Th2 ayant déjà été activés par leur antigène comportent des lymphocytes effecteurs mémoires qui ont un rôle de sentinelle dans les tissus et des lymphocytes « central mémoires » localisés dans les organes lymphoïdes où ils pourront être réactivés rapidement en cas d'un second contact avec l'allergène [18].

La notion de sous-populations ayant un profil fixe a été écorcée ces dernières années [1–5]. Ce concept reposait sur le fait qu'il était possible d'obtenir des lymphocytes différenciés Th1 ou Th2 lors de culture in vitro en présence de cytokines (de l'IL-4 pour les Th2) et d'anticorps bloquant les autres voies (anticorps anti-IL-12 et anti-interféron (IFN) γ bloquant la voie de différenciation en Th1). Le profil de production de cytokines était transmis aux cellules filles sans possibilité de retour en arrière. Le lymphocyte Th2 ne pouvait pas produire d'IFN γ

ou d'IL-17. Il est apparu récemment que même des lymphocytes Th2 pouvaient donner naissance in vivo à des cellules ayant un profil mixte Th2/Th1 ou Th2/Th17, démontrant la plasticité des lymphocytes. Des profils de production de cytokines « Th1 » et « Th17 » ont été mis en évidence en particulier dans des asthmes sévères posant la question d'entités différentes de l'asthme allergique lié aux LTh2 ou de la possibilité du rôle de cellules immunitaires capables de produire différents types de cytokines. De plus, les lymphocytes Th9 capables de produire de l'IL-9, une cytokine capable à elle seule d'induire les caractéristiques biologiques et cliniques de l'asthme sont proposés comme un stade de différenciation plus poussé des Th2 [19]. Leur différenciation dépend de l'IL-4 et du TGF β . Il est également possible que ces cellules appartiennent à un lignage différent. Ceci n'a pas qu'un intérêt théorique puisque identifier le type de lymphocytes et comprendre leur rôle chez un patient ou un groupe de patients pourrait permettre de proposer un traitement mieux ciblé.

3. Les cytokines Th2 dans la pathologie

Toutes les cytokines produites par les lymphocytes Th2 contribuent à la pathologie dans l'asthme comme cela a été bien démontré dans des modèles expérimentaux d'asthme allergique. L'IL-4 produite par les LTh2 et des cellules de la réponse immune innée (NKT, mastocytes et basophiles activés) permet d'amplifier la réponse Th2 car elle est la cytokine-clé permettant la différenciation de nouveaux LTh2. L'IL-4 contribue à la maturation et au recrutement des cellules de la réponse immune innée ainsi qu'à la production d'immunoglobulines de type E (IgE) par les lymphocytes B. L'IL-5 produite par les LTh2, des mastocytes, les ILC2 permet la différenciation des éosinophiles à partir de progéniteurs de la moelle osseuse, leur différenciation et leur migration dans les tissus. L'IL-13 produite par les LTh2, les éosinophiles, les mastocytes et les ILC2, semble avoir un rôle majeur dans les lésions tissulaires de l'asthme [20]. Comme l'IL-4, elle promeut la production d'IgE par les lymphocytes B et peut donc favoriser l'activation des mastocytes. Elle a aussi de multiples cibles tissulaires : les cellules endothéliales, épithéliales, musculaires lisses des bronchioles, macrophages. L'IL-13 active des gènes comme ceux codant le canal chlore CLCA1, le TGF α , l'adénosine ce qui aboutit à une hyperproduction de mucus et à la diminution de la clairance muco-ciliaire et donc à une obstruction des voies aériennes. Via la sécrétion de chimiokines (MCP-1, MCP-5, éotaxine) et l'expression de la molécule d'adhésion V-CAM1 sur l'endothélium, l'IL-13 favorise le recrutement des cellules inflammatoires dans les poumons. L'IL-13 augmente aussi directement et indirectement, le tonus musculaire de la bronchiole et sa capacité à se contracter en réponse à des stimuli broncho-constricteurs normalement trop faibles pour déclencher la contraction. En ce sens, cette cytokine est impliquée dans l'hyperréactivité bronchique. Finalement, l'IL-13 contribue à la fibrose en augmentant la production de collagène, de TGF β , l'activation de ce dernier et la prolifération des fibroblastes [20].

4. La thérapie et les pistes thérapeutiques actuelles

Couramment les traitements sont symptomatiques incluant des agents bêta-adrénergiques qui vont relaxer le muscle lisse, des corticoïdes inhalés ou ingérés en cas d'asthme sévère, des anti-leukotriènes et dans certains cas des anticorps anti-IgE (omalizumab). La seule approche spécifique à l'heure actuelle consiste en des protocoles d'immunothérapie par voie sous-cutanée ou sublinguale pour tenter de contrer la réponse immune délétère en induisant des Treg spécifiques de l'allergène. Le succès de cette approche est démontré même si elle est encore restreinte [21].

Les pistes actuelles s'orientent vers la neutralisation des cytokines impliquées dans l'asthme IL-4, IL-5, IL-9 et IL-13 avec l'idée qu'inhiber plusieurs de ces cytokines pourrait être bénéfique dans l'asthme. De ce point de vue, un anticorps dirigé contre la chaîne α du récepteur de l'IL-4 partagée par le récepteur de l'IL-4 et celui de l'IL-13 a donné des résultats positifs dans des asthmes persistants avec une éosinophilie élevée [22]. L'inhibition de CCR3 et CCR4 est aussi testée chez les sujets asthmatiques avec des résultats non concluants pour le moment [5]. Un antagoniste oral de CCR3 est développé et ciblerait essentiellement les éosinophiles. CCR4 qui est exprimé par les Th2 est également une cible d'intérêt avec des anticorps bloquants qui sont testés dans le cadre de rhinites allergiques et d'antagonistes en développement [23]. D'autres molécules apparaissent comme des cibles potentielles telles que CRTH2, le récepteur à la prostaglandine D2 exprimé par les lymphocytes Th2 mémoires, par les éosinophiles et par les mastocytes [5,24]. CRTH2 est impliqué dans le chimiotactisme de ces cellules en réponse à la prostaglandine D2 et leur activation. Différents composés ciblant cette molécule sont en cours d'évaluation [5]. Des oligonucléotides issus de virus se fixent aux récepteurs TLR7 et 9 dans les cellules dendritiques plasmacytoïdes causant la production d'interféron de type 1, ce qui favorise l'élimination des virus et une réponse immune Th1. Il pourrait y avoir un défaut de ce processus chez les sujets asthmatiques et dans ce sens des agonistes de TLR9 ont démontré leur efficacité dans une étude récente [25]. Une autre piste est de cibler des molécules de signalisation nécessaires pour la production de cytokines comme l'IL-4. La tyrosine kinase itk est intéressante car elle joue un rôle plus important dans les Th2 et en particulier dans la signalisation calcique que dans les autres types de lymphocytes. Des petites molécules inhibitrices sont développées et pourraient être utilisées dans l'asthme [26] d'autant que l'absence d'itk favorise le développement de T régulateurs [27], ce qui pourrait aussi être bénéfique dans l'asthme.

5. La signalisation calcique dans les lymphocytes T : une régulation qui n'est pas univoque

L'augmentation de concentration de calcium intracellulaire ($[Ca]_i$) résultant de l'activation du TCR est requise pour l'expression ou la répression de plus de 75 % des gènes contrôlés par le TCR. Depuis les années 2005–2006, il est classiquement admis que la reconnaissance du peptide antigénique par le TCR

déclenche l'activation de tyrosine kinases (src et ZAP-70) qui vont phosphoryler des molécules adaptatrices et des enzymes clés. Ceci va permettre la formation de plateformes de signalisation mettant en contact des enzymes et leurs cibles dans une zone privilégiée où la cellule présentatrice de l'antigène est en contact avec le lymphocyte T. Parmi ces enzymes, la phospholipase C gamma clive le phosphatidylinositol, 4-5 biphosphate en inositol triphosphate (IP3) et diacylglycérol (Fig. 3). L'IP3 se fixe sur son récepteur (RIP3) à la membrane du réticulum endoplasmique (RE) [28–30]. Les concentrations de Ca^{2+} sont plus élevées dans le RE (0,5–1 μM) que dans le cytoplasme (100 nM). Le RIP3 est un canal calcique qui va permettre le passage d'ions Ca^{2+} du RE dans le cytoplasme. Cette diminution des stocks de Ca^{2+} dans le RE est perçue par la molécule STIM-1 qui peut fixer le Ca^{2+} . La diminution de la fixation de Ca^{2+} sur STIM-1 entraîne un changement de conformation de cette protéine et sa migration pour venir au voisinage de la membrane plasmique au contact des canaux calciques membranaires ORAI1. Les stocks de Ca^{2+} sont limités et n'induisent qu'une augmentation peu importante de la $[Ca]_i$. Par contre, l'ouverture des canaux calciques ORAI contrôlée par STIM-1 va permettre une entrée soutenue de Ca^{2+} dans la cellule, la concentration de Ca^{2+} dans le milieu extracellulaire étant beaucoup plus élevée (1–2 mM) que dans le cytoplasme. La voie des calmodulines kinases et surtout la fixation du Ca^{2+} sur la calmoduline entraîne la fixation du complexe sur la calcineurine (une cible de la ciclosporine A) et son activation. La calcineurine est une phosphatase qui déphosphoryle le facteur de transcription NFAT démasquant un site de localisation nucléaire et donc son transport dans le noyau où il va activer ses gènes cibles comme ceux codant des cytokines. L'IL-4 est particulièrement dépendante de la voie calcique.

Il peut paraître illusoire d'essayer d'inhiber la voie calcique pour traiter les pathologies allergiques puisque cette réponse est ubiquitaire et capitale dans la majorité des cellules. Toutefois, ceci ne prend pas en compte le fait que la régulation de la réponse calcique diffère selon le type de lymphocytes [31]. Par exemple, la $[Ca]_i$ est deux fois plus élevée dans les lymphocytes Th2 que dans des lymphocytes Th1 au repos alors que la stimulation par le TCR induit une augmentation beaucoup plus faible dans les LTh2 par rapport à ce qui est observé dans les Th1. La réponse est intermédiaire dans les Th17 [32]. Ceci nous a conduit à investiguer les éléments qui pouvaient réguler la $[Ca]_i$ dans les Th2. Les canaux calciques à la membrane sont parmi les composants majeurs qui régulent la $[Ca]_i$ puisqu'ils permettent une entrée de Ca^{2+} à partir du milieu extracellulaire. Il est vraisemblable que d'autres canaux que les canaux ORAI contribuent à l'entrée de Ca^{2+} dans les lymphocytes et parmi ceux-ci les canaux Ca_v1 (pour dépendant du voltage) sont suspectés pouvoir être impliqués car plusieurs travaux dont les nôtres montrent qu'il est possible de les détecter [33–35] en particulier dans les LTh2 murins et humains [29,36–42].

6. Les canaux calciques Ca_v et leur rôle dans les lymphocytes T

Les canaux Ca_v sont formés par une sous-unité principale $\alpha1$ et des sous-unités auxiliaires essentiellement bêta et alpha2-delta

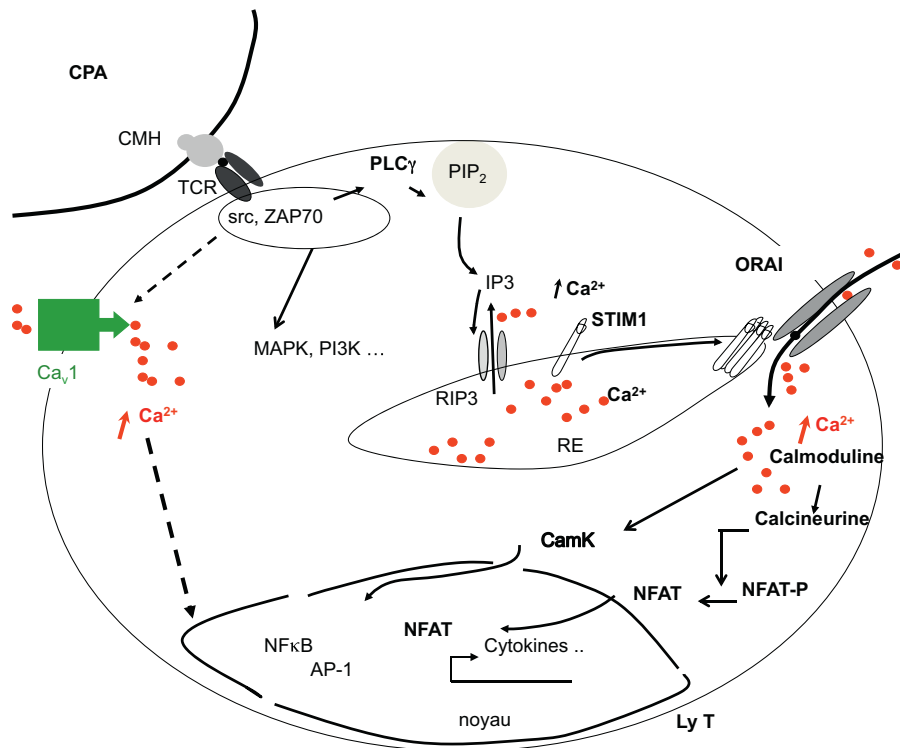


Fig. 3. Signalisation calcique dans les lymphocytes T. La reconnaissance du peptide antigénique associé aux molécules de classe II du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) à la surface de la cellule présentatrice de l'antigène (CPA) par le récepteur T pour l'antigène (TCR) du lymphocyte T (Ly T) entraîne l'activation d'enzymes dont la phospholipase C gamma (PLC γ) qui clive le phosphatidyl inositol biphosphate (PIP₂) en inositol triphosphate (IP₃) et diacylglycérol. L'IP₃ se fixe sur ses récepteurs (RIP3) à la membrane du réticulum endoplasmique (RE) libérant les stocks de Ca²⁺ du RE dans le cytosol. Cette diminution des stocks du RE est perçue par le senseur au Ca²⁺ STIM1 qui va migrer le long de la membrane du RE pour venir au voisinage des canaux calciques membranaires ORAI1. Ceux-ci vont alors s'ouvrir permettant une entrée soutenue de Ca²⁺ du milieu extracellulaire dans le cytoplasme. L'augmentation de la concentration de Ca²⁺ active la voie des calmoduline kinases (CamK) et surtout l'activation de la calcineurine, une phosphatase qui clive le facteur de transcription NFAT lui permettant de se localiser dans le noyau où il va coopérer avec d'autres facteurs pour activer des gènes cibles dont ceux des cytokines. À côté des canaux ORAI1 d'autres canaux calciques contribuent à l'entrée de Ca²⁺ dans la cellule dont les canaux dépendant du voltage Ca_V1.

(Fig. 4) [43]. La sous-unité α_1 des canaux Ca_V1 est codée par quatre gènes codant Ca_V1.1, Ca_V1.2, Ca_V1.3 et Ca_V1.4. Ca_V1.1 est exprimée dans les cellules musculaires striées. Il existe une forme cardiaque et une forme neuronale de Ca_V1.2 et les souris déficientes pour Ca_V1.2 meurent in utero, ce canal jouant un rôle capital dans la contractilité cardiaque. Ca_V1.2 est aussi

exprimé dans les cellules musculaires lisses et les neurones. Ca_V1.3 prédomine dans le nœud auriculo-ventriculaire, et les tissus neuroendocrines, les neurones mécano-sensoriels de la cochlée et peut être co-exprimé avec les canaux Ca_V1.2. Néanmoins, les canaux Ca_V1.2 et Ca_V1.3 n'ont pas le même rôle puisque les souris Ca_V1.3 déficientes sont viables même si elles sont sourdes avec un bloc de branche, et quelques problèmes cognitifs [44]. Ca_V1.4 est la forme rétinienne et son absence est responsable d'une cécité nocturne stationnaire liée à l'X. Les sous-unités bêta et alpha-2-delta sont codées par 4 gènes pour chacune d'entre elles. Elles sont importantes pour l'expression du canal à la membrane et pour sa régulation. Ces canaux ont particulièrement été explorés dans les cellules excitables mais un nombre croissant d'études montre leur rôle dans les lymphocytes T :

- des ARN messagers codant les sous-unités α_1 et auxiliaires sont détectés dans les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ murins et humains ;
- des inhibiteurs pharmacologiques de ces canaux comme les dihydropyridines utilisés couramment dans le traitement de l'hypertension artérielle diminuent la réponse calcique et la production de cytokines au moins quand ils sont utilisés dans des cultures in vitro ;

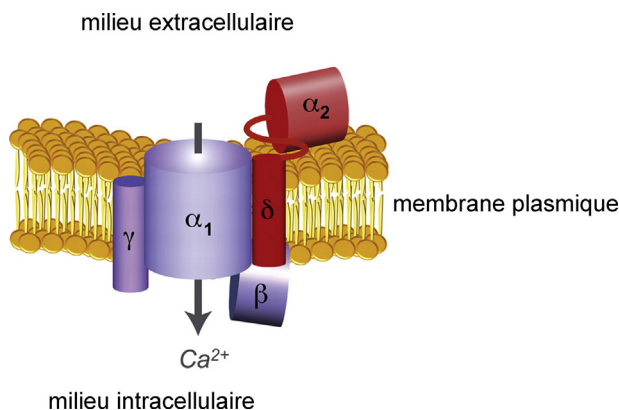


Fig. 4. Structure des canaux Ca_V1. Les canaux Ca_V1 sont constitués de la sous-unité α_1 qui forme le conduit pour les ions Ca²⁺. Les sous-unités β et α_2 - δ dites auxiliaires permettent la localisation du canal à la membrane plasmique de la cellule et modulent les propriétés biophysiques du canal.

- des souris dépourvues des sous-unités $\text{Ca}_v1.4 \alpha_1$, $\text{Ca}_v\beta 3$ et $\text{Ca}_v\beta 4$ montrent des anomalies immunitaires [33–35,45].

En particulier, les souris déficientes pour $\text{Ca}_v1.4$ ont une diminution du nombre de lymphocytes T en périphérie, une diminution de l'augmentation de la $[\text{Ca}]_i$ après activation du TCR et une diminution de la réponse immunitaire en particulier vis-à-vis de virus. Nous avons étudié l'expression des canaux Ca_v1 dans les cellules isolées à partir du sang de donneurs sains [42]. Ces canaux sont détectables principalement dans les lymphocytes T et B et dans les éosinophiles qui expriment surtout $\text{Ca}_v1.3$. Ils sont quasi absents des neutrophiles et des monocytes au moins quand ils ne sont pas activés. Parmi les lymphocytes T naïfs, la forme $\text{Ca}_v1.4$ prédomine ce qui est en accord avec le rôle présumé de cette sous-unité dans la survie des lymphocytes. C'est aussi la forme qui est retrouvée dans les lymphocytes centraux mémoires circulants qui devront être réactivés par l'antigène pour produire des cytokines que ces cellules soient programmées pour être Th1 ou Th17. De façon surprenante, l'activation de lymphocytes T naïfs via le TCR conduit à une diminution rapide de l'expression des canaux $\text{Ca}_v1.4$ suggérant un rôle préférentiel de cette sous-unité dans les lymphocytes T naïfs voire les lymphocytes T quiescents.

7. Les canaux calciques Ca_v acteurs importants de la réponse Th2

En différenciant des lymphocytes T de souris en lymphocytes Th1 et Th2 par l'ajout des cytokines (IL-12 pour les Th1 et IL-4 pour les Th2) et des anticorps anti-cytokines adéquats (anti-IL-4 pour les Th1 et anti-IFN γ pour les Th2), nous avons montré que l'expression faible de $\text{Ca}_v1.2$ dans les lymphocytes TCD4⁺ augmente considérablement dans les Th2 et est perdue dans les Th1. Nous avons choisi de transfecter des LTh2 avec des oligodéoxynucléotides de 20 à 30 bases dont la séquence est complémentaire d'une séquence dans l'ARN messager de $\text{Ca}_v1.2$ et nous avons fait de même pour $\text{Ca}_v1.3$. Ces ADN ($\text{Ca}_v1.2\text{AS}$ et $\text{Ca}_v1.3\text{AS}$) sont capables de s'hybrider avec les ARN messagers correspondants. Il est vraisemblable que le complexe ARN-ADN active l'enzyme RNaseH causant la

dégradation de l'ARN messager ciblé. De fait, la transfection des Th2 avec $\text{Ca}_v1.2$ ou $\text{Ca}_v1.3\text{AS}$ aboutit à la perte de plus de 50 % de l'ARN messager et de la protéine. La réponse calcique des Th2 transfectés est beaucoup plus faible que celle des Th2 contrôles et ceci est associé à une diminution marquée de la production de l'IL-4, IL-5 et IL-13, toutes ces cytokines étant délétères dans l'asthme. Nous avons testé si les lymphocytes Th2 étaient toujours capables de causer un asthme dans un modèle de transfert adoptif. Nous avons injecté par voie intraveineuse des LTh2 spécifiques de l'ovalbumine transfectés ou non avec un mélange de $\text{Ca}_v1.2$ et $\text{Ca}_v1.3\text{AS}$ chez des souris qui étaient exposées à de l'ovalbumine par voie intra-nasale [39]. Nous avons tracé les cellules injectées et recherché les signes cliniques, histologiques et biologiques de la maladie. Les Th2 transfectés avec un mélange de $\text{Ca}_v1.2$ et $\text{Ca}_v1.3\text{AS}$ sont parfaitement capables de se localiser dans les ganglions péri-bronchiques et les poumons. Ils prolifèrent normalement mais ne produisent pas de cytokines après re-stimulation et n'induisent pas d'asthme contrairement à ce que font des Th2 contrôles. Par contre, des LTh1 transfectés avec le mélange de $\text{Ca}_v1.2$ et $\text{Ca}_v1.3\text{AS}$ sont capables de causer une inflammation pulmonaire associée à un nombre élevé de neutrophiles montrant la sélectivité d'impact des Ca_v1AS [39].

L'intérêt des oligonucléotides anti-sens natifs ou dont la structure est modifiée pour améliorer la stabilité de la molécule dans les pathologies respiratoires est axé sur le fait qu'ils peuvent cibler les cellules dans le tractus respiratoire et qu'ils y restent confinés évitant une dissémination systémique [46]. Pour tester l'efficacité des Ca_v1AS , nous avons immunisé des souris avec de l'ovalbumine mixée avec de l'hydroxyde d'alumine ce qui est connu pour permettre la différenciation de LTh2 in vivo et 15 jours plus tard, une fois la réponse Th2 établie, nous avons fait inhaler l'ovalbumine et ou non les Ca_v1AS . Les Ca_v1AS réduisent considérablement l'inflammation pulmonaire (Fig. 5), l'augmentation des IgE sériques (un paramètre associé à l'IL-4 et l'IL-13) et l'hyperréactivité bronchique à la méthacholine (un analogue de l'acétylcholine) [39]. Nous ne pouvons pas exclure qu'in vivo, les Ca_v1AS agissent sur d'autres cibles cellulaires comme les éosinophiles ou les cellules musculaires lisses péri-bronchiolaires. En effet, les canaux Ca_v1 et en particulier $\text{Ca}_v1.2$

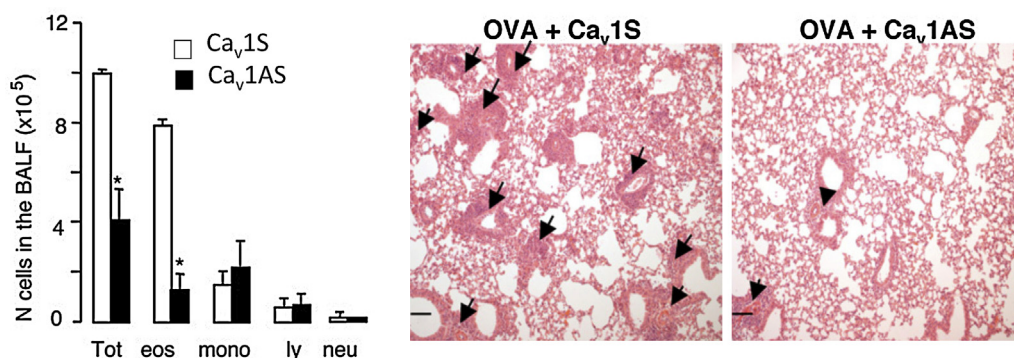


Fig. 5. Les canaux $\text{Ca}_v1.2$ et $\text{Ca}_v1.3$ comme cible thérapeutique dans l'asthme expérimental. Des souris BALB/c sont immunisées avec de l'ovalbumine (OVA) et 15 jours plus tard, de l'OVA est instillé par voie intra-nasale avec des oligonucléotides spécifiques des canaux $\text{Ca}_v1.2$ et $\text{Ca}_v1.3$ (Ca_v1AS , qui diminuent spécifiquement l'expression de ces canaux) ou des oligonucléotides contrôles (Ca_v1S). Sont ensuite analysés les nombres de cellules inflammatoires dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire (BALF) et des coupes de poumons sont réalisées et colorées avec de l'hématoxyline et l'éosine. Les flèches indiquent les infiltrats de cellules inflammatoires. Tot : nombre total ; eos : éosinophiles ; mono : monocytes ; ly : lymphocytes ; neu : neutrophiles.

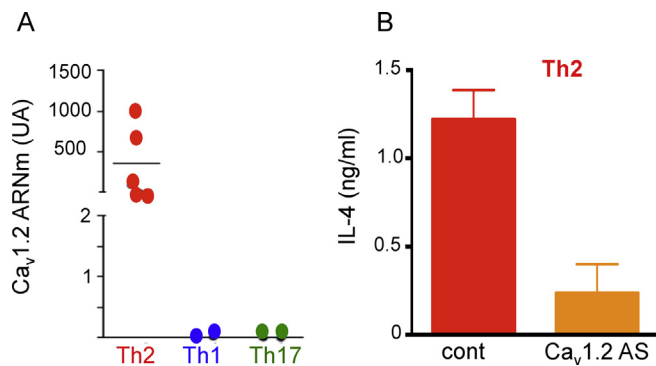


Fig. 6. Expression sélective des canaux $Ca_v1.2$ dans les lymphocytes Th2 humains et rôle dans la production de cytokines Th2. Des lymphocytes Th2 sont purifiés à partir du sang de donneurs sains et testés pour l'expression d'ARN messagers codant pour les canaux $Ca_v1.2$ (A). Cette expression n'est pas détectée dans des lymphocytes Th1 ou Th17. Chaque point correspond à un échantillon. UA : unités arbitraires. B. Des lymphocytes Th2 humains ont été purifiés ; l'expression des canaux $Ca_v1.2$ a été réduite par transfection avec des oligonucléotides anti-sens spécifiques de ces canaux ce qui est associé à une diminution de la capacité à produire de l'IL-4, la cytokine-signature des Th2.

participent à l'influx de calcium dans les cellules musculaires lisses ce qui est nécessaire à la bronchoconstriction typique de l'asthme. Des inhibiteurs ciblant ce canal pourraient donc agir à la fois sur des cellules musculaires péri-bronchiques et les lymphocytes Th2.

Les données obtenues chez la souris sont extrapolables à l'homme. En effet l'isolation de Th2 mémoires humains basée sur la purification de lymphocytes CD4+ exprimant le marqueur CRTH2 (récepteur à la prostaglandine D2 considéré comme un des meilleurs marqueurs des Th2). Ces cellules expriment $Ca_v1.2$ (Fig. 6) qui apparaît comme un marqueur stable des lymphocytes Th2 puisque cette expression est maintenue après activation soutenue en présence d'IL-4 et d'anticorps anti-IFN γ ou d'IL-7 et d'IL-15. Les LTh2 expriment aussi les sous-unités auxiliaires β et $\alpha 2$ -delta permettant de conclure que tous les éléments requis pour constituer un canal complet sont présents dans les Th2 [42]. Par contre, les sous-unités $\alpha 1$ $Ca_v1.2$ ne sont pas retrouvées dans des LTh1 effecteurs, des Th9 ou des Th17 [42]. L'expression de ces canaux est sélective des Th2 et la diminution d'expression des canaux $Ca_v1.2$ diminue notablement l'augmentation de $[Ca]_i$ suite à leur activation ainsi que la production de cytokines, ce qui en fait une cible thérapeutique potentielle dans les pathologies allergiques. Comme l'activation des Th2 augmente encore l'expression des canaux $Ca_v1.2$, une étude de recherche clinique est en cours pour investiguer l'expression de ces canaux dans les lymphocytes de sujets asthmatiques versus des sujets contrôles ne présentant pas de pathologie respiratoire ou infectieuse. Nous cherchons également s'il est possible de détecter les canaux Ca_v1 présents dans les cellules inflammatoires des poumons chez les sujets asthmatiques.

8. Régulation des canaux Ca_v1 dans les cellules Th2 : la piste de la PKC α

Les canaux Ca_v1 s'ouvrent classiquement dans les cellules excitables comme les neurones quand il y a un changement

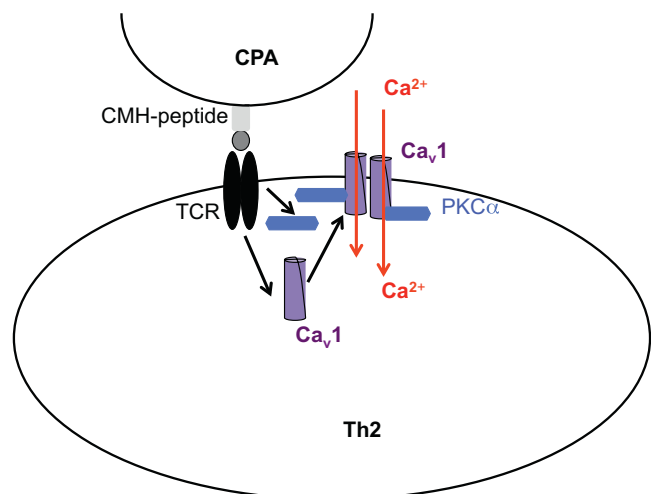


Fig. 7. Rôle éventuel de la PKC α dans l'ouverture des canaux Ca_v1 dans les lymphocytes T. L'activation du TCR du lymphocyte Th2 par le complexe peptide dérivé de l'antigène présenté par les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) activerait la protéine kinase C (PKC) α et favoriserait l'expression à la membrane des canaux Ca_v1 . Leur interaction permettrait l'ouverture des canaux Ca_v1 et une entrée de Ca^{2+} dans la cellule.

important de potentiel de la membrane du fait par exemple d'une entrée d'ions chargés positivement comme les ions Na^+ dans la cellule. Ceci n'est pas le cas dans des lymphocytes T posant le problème de la façon dont ces canaux s'ouvrent dans les LTh2. Des auteurs ont proposé un mode de régulation original des canaux $Ca_v1.2$ dans les cellules musculaires lisses artériolaires. Les mêmes canaux se comportent très différemment selon qu'ils sont isolés dans la membrane ou qu'ils sont regroupés dans des zones où ils interagissent avec la protéine kinase C (PKC) α , une des 11 isoformes des PKC. L'association avec la PKC augmente considérablement la probabilité d'ouverture des canaux Ca_v1 par rapport à celle des canaux isolés faisant qu'un très petit nombre de canaux associés à cette kinase suffit pour permettre une entrée de calcium importante [47–49]. Un activateur des PKC suffit à induire une entrée de calcium dans les lymphocytes Th2 qui expriment plusieurs isoformes de la PKC dont la PKC α . Un inhibiteur sélectif de la PKC α diminue l'entrée de calcium dans les Th2 humains sans affecter les Th1 [42]. Cet inhibiteur abolit quasiment la production de cytokines par les Th2 et n'affecte pas la production d'IFN γ par les Th1. Ceci suggère fortement que la PKC α est impliquée dans la régulation des canaux Ca_v1 dans les Th2 comme dans les cellules musculaires (Fig. 7). De plus, les résultats montrent que la PKC α n'est impliquée dans aucune des voies de signalisation aboutissant à la production d'IFN γ par les Th1 humains [42].

9. Applications thérapeutiques potentielles

La dissection de la (des) voie(s) qui contrôle(nt) la régulation de la signalisation calcique dans les Th2 versus les autres populations de lymphocytes T, d'une part, et dans les cellules inflammatoires associées à la réponse Th2 pourra permettre d'identifier des cibles thérapeutiques potentielles au moins dans les asthmes allergiques. De ce point de vue, la PKC α est une

cible intéressante. Probablement du fait de la redondance des PKC, les souris PKC α -/- sont viables et ont même une résistance à l'insuffisance cardiaque [50]. La PKC α a déjà été proposée comme une cible thérapeutique dans des cancers y compris bronchiques. Des anti-sens spécifiques ont été développés et sont sans danger même si leur efficacité dans le traitement de ces cancers n'a pas été démontrée. Il est donc possible que des anti-sens contre la PKC α ou des inhibiteurs pharmacologiques spécifiques [51] soient efficaces dans des pathologies associées aux Th2. Au total, la connaissance des séquences des canaux Ca $_v$ 1 sélectivement exprimés dans les Th2 ainsi que des maillons sélectifs de la régulation de ces canaux dans les lymphocytes T offre l'opportunité de développer des agents thérapeutiques inhibant le plus spécifiquement possible le fonctionnement de ces canaux dans les Th2 avec un possible bénéfice dans les pathologies allergiques.

Déclaration d'intérêts

Les auteurs déclarent ne pas avoir de conflits d'intérêts en relation avec cet article.

Références

- [1] Zhou L, Chong MM, Littman DR. Plasticity of CD4+ T cell lineage differentiation. *Immunity* 2009;30:646–55.
- [2] Locksley RM. Nine lives: plasticity among T helper cell subsets. *J Exp Med* 2009;206:1643–6.
- [3] Murphy KM, Stockinger B. Effector T cell plasticity: flexibility in the face of changing circumstances. *Nat Immunol* 2010;11:674–80.
- [4] O'Shea JJ, Paul WE. Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4+ T cells. *Science* 2010;327:1098–115.
- [5] Islam SA, Luster AD. T cell homing to epithelial barriers in allergic disease. *Nat Med* 2012;18:705–15.
- [6] Kim HY, DeKruyff RH, Umetsu DT. The many paths to asthma: phenotype shaped by innate and adaptive immunity. *Nat Immunol* 2010;11:577–84.
- [7] Holgate ST, Davies DE. Rethinking the pathogenesis of asthma. *Immunity* 2009;31:362–7.
- [8] Pulendran B, Artis D. New paradigms in type 2 immunity. *Science* 2012;337:431–5.
- [9] Neill DR, Wong SH, Bellosi A, Flynn RJ, Daly M, Langford TK, et al. Nuocytes represent a new innate effector leukocyte that mediates type-2 immunity. *Nature* 2010;464:1367–70.
- [10] Licona-Limon P, Kim LK, Palm NW, Flavell RA. TH2, allergy and group 2 innate lymphoid cells. *Nat Immunol* 2013;14:536–42.
- [11] Bartemes KR, Iijima K, Kobayashi T, Kephart GM, McKenzie AN, Kita H. IL-33-responsive lineage- CD25+ CD44(hi) lymphoid cells mediate innate type 2 immunity and allergic inflammation in the lungs. *J Immunol* 2012;188:1503–13.
- [12] Doherty TA, Khorram N, Lund S, Mehta AK, Croft M, Broide DH. Lung type 2 innate lymphoid cells express cysteinyl leukotriene receptor 1, which regulates TH2 cytokine production. *J Allergy Clin Immunol* 2013;132:205–13.
- [13] Lambrecht BN, Hammad H. Biology of lung dendritic cells at the origin of asthma. *Immunity* 2009;31:412–24.
- [14] Williams JW, Tjota MY, Clay BS, Vander Lugt B, Bandukwala HS, Hrusch CL, et al. Transcription factor IRF4 drives dendritic cells to promote Th2 differentiation. *Nat Com* 2013;4:2990, <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms3990>.
- [15] Kuipers H, Lambrecht BN. The interplay of dendritic cells, Th2 cells and regulatory T cells in asthma. *Curr Opin Immunol* 2004;16:702–8.
- [16] Guo L, Hu-Li J, Paul WE. Probabilistic regulation of IL-4 production in Th2 cells: accessibility at the Il4 locus. *Immunity* 2004;20:193–203.
- [17] Julia V. CX3CL1 in allergic diseases: not just a chemotactic molecule. *Allergy* 2012;67:1106–10.
- [18] Endo Y, Hirahara K, Yagi R, Tumes DJ, Nakayama T. Pathogenic memory type Th2 cells in allergic inflammation. *Trends Immunol* 2014;35:69–78.
- [19] Jabeen R, Kaplan MH. The symphony of the ninth: the development and function of Th9 cells. *Curr Opin Immunol* 2012;24:303–7.
- [20] Wills-Karp M. Interleukin-13 in asthma pathogenesis. *Immunol Rev* 2004;202:175–90.
- [21] van Hage M, Pauli G. New vaccines for mammalian allergy using molecular approaches. *Front Immunol* 2014;5: article 81:1–6.
- [22] Wenzel S, Ford L, Pearlman D, Spector S, Sher L, Skobieranda F, et al. Dupilumab in persistent asthma with elevated eosinophil levels. *N Engl J Med* 2013;368:2455–66.
- [23] Pease JE, Horuk R. Recent progress in the development of antagonists to the chemokine receptors CCR3 and CCR4. *Expert Opin Drug Discov* 2014;9:467–83.
- [24] Apter AJ. Advances in adult asthma diagnosis and treatment in 2013. *J Allergy Clin Immunol* 2014;133:49–56.
- [25] Beeh KM, Kanniss F, Wagner F, Schilder C, Naudts I, Hammann-Haenni A, et al. The novel TLR-9 agonist QbG10 shows clinical efficacy in persistent allergic asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2013;131:866–74.
- [26] Kaur M, Bahia MS, Silakari O. Inhibitors of interleukin-2 inducible T-cell kinase as potential therapeutic candidates for the treatment of various inflammatory disease conditions. *Eur J Pharm Sci* 2012;47:574–88.
- [27] Gomez-Rodriguez J, Wohlfert EA, Handon R, Meylan F, Wu JZ, Anderson SM, et al. Itk-mediated integration of T cell receptor and cytokine signaling regulates the balance between Th17 and regulatory T cells. *J Exp Med* 2014;211:529–43.
- [28] Vig M, Kinet JP. Calcium signaling in immune cells. *Nat Immunol* 2009;10:21–7.
- [29] Robert V, Triffaux E, Savignac M, Pelletier L. Calcium signalling in T-lymphocytes. *Biochimie* 2011;93:2087–94.
- [30] Feske S, Skolnik EY, Prakriya M. Ion channels and transporters in lymphocyte function and immunity. *Nat Rev Immunol* 2012;12:532–47.
- [31] Robert V, Triffaux E, Savignac M, Pelletier L. Singularities of calcium signaling in effector T-lymphocytes. *Biochim Biophys Acta* 2013;1833:1595–602.
- [32] Weber KS, Miller MJ, Allen PM. Th17 cells exhibit a distinct calcium profile from Th1 and Th2 cells and have Th1-like motility and NF-AT nuclear localization. *J Immunol* 2008;180:1442–50.
- [33] Badou A, Jha MK, Matza D, Mehal WZ, Freichel M, Flockerzi V, et al. Critical role for the beta regulatory subunits of Ca $_v$ channels in T lymphocyte function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:15529–34.
- [34] Omilusik K, Priatel JJ, Chen X, Wang YT, Xu H, Choi KB, et al. The Ca $_v$ 1.4 calcium channel is a critical regulator of T cell receptor signaling and naive T cell homeostasis. *Immunity* 2011;35:349–60.
- [35] Badou A, M.K. J, Matza D, Flavell RA. Emerging roles of L-type voltage-gated and other calcium channels in T lymphocytes. *Front Immunol* 2013;4:243.
- [36] Savignac M, Badou A, Moreau M, Leclerc C, Guery JC, Paulet P, et al. 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* 2001;15:1577–9.
- [37] Savignac M, Gomes B, Gallard A, Narbonne S, Moreau M, Leclerc C, et al. Dihydropyridine receptors are selective markers of Th2 cells and can be targeted to prevent Th2-dependent immunopathological disorders. *J Immunol* 2004;172:5206–12.
- [38] Gomes B, Savignac M, Cabral MD, Paulet P, Moreau M, Leclerc C, et al. The cGMP/protein kinase G pathway contributes to dihydropyridine-sensitive calcium response and cytokine production in TH2 lymphocytes. *J Biol Chem* 2006;281:12421–7.
- [39] Djata Cabral M, Paulet PE, Robert V, Gomes B, Renoud ML, Savignac M, et al. Knocking-down Cav1 calcium channels implicated in Th2-cell activation prevents experimental asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2010;181:1310–7.
- [40] Robert V, Triffaux E, Savignac M, Pelletier L. Implication des canaux calciques dans la fonction de lymphocytes T responsables de l'asthme allergique. *Rev Fr Allergol* 2011;51:541–7.

- [41] Pelletier L, Savignac M. Ca(2+) signaling in T-cell subsets with a focus on the role of Ca_v1 channels: possible implications in therapeutics. *Front Immunol* 2013;4:150.
- [42] Robert V, Triffaux E, Paulet PE, Guery JC, Pelletier L, Savignac M. Protein kinase C-dependent activation of Ca_v1.2 channels selectively controls human TH2-lymphocyte functions. *J Allergy Clin Immunol* 2014;133:1175–83.
- [43] Catterall WA. Structure and regulation of voltage-gated Ca₂⁺ channels. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2000;16:521–55.
- [44] Platzer J, Engel J, Schrott-Fischer A, Stephan K, Bova S, Chen H, et al. Congenital deafness and sinoatrial node dysfunction in mice lacking class D L-type Ca₂⁺ channels. *Cell* 2000;102:89–97.
- [45] Jha MK, Badou A, Meissner M, McRory JE, Freichel M, Flockerzi V, et al. Defective survival of naive CD8⁺ T lymphocytes in the absence of the beta3 regulatory subunit of voltage-gated calcium channels. *Nat Immunol* 2009;10:1275–82.
- [46] Popescu FD, Popescu F. A review of antisense therapeutic interventions for molecular biological targets in asthma. *Biologics* 2007;1:271–83.
- [47] Navedo MF, Amberg GC, Votaw VS, Santana LF. Constitutively active L-type Ca₂⁺ channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:11112–7.
- [48] Santana LF, Navedo MF, Amberg GC, Nieves-Cintrón M, Votaw VS, Ufret-Vincenty CA. Calcium sparklets in arterial smooth muscle. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2008;35:1121–6.
- [49] Santana LF, Navedo MF. Natural inequalities: why some L-type Ca₂⁺ channels work harder than others. *J Gen Physiol* 2010;136:143–7.
- [50] Hambleton M, York A, Sargent MA, Kaiser RA, Lorenz JN, Robbins J, et al. Inducible and myocyte-specific inhibition of PKCα enhances cardiac contractility and protects against infarction-induced heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007;293:H3768–71.
- [51] Ladage D, Tilemann L, Ishikawa K, Correll RN, Kawase Y, Houser SR, et al. Inhibition of PKCα/β with ruboxistaurin antagonizes heart failure in pigs after myocardial infarction injury. *Circ Res* 2011;109:1396–400.