

Calcium et activation lymphocytaire T

La stimulation des lymphocytes T *via* différentes molécules de surface dites d'activation, comme le récepteur T/CD3, s'accompagne d'une élévation rapide et soutenue du calcium cytosolique. Une des composantes de cette élévation est liée à l'action de l'IP₃ qui libère du Ca²⁺ des réserves intracellulaires du réticulum endoplasmique. Parallèlement, se produit une entrée de Ca²⁺ en provenance du milieu extracellulaire, donnant une augmentation durable de la concentration de Ca²⁺ intracellulaire. Le mécanisme exact du déclenchement de ce flux entrant de calcium reste controversé. Cependant cette phase d'augmentation prolongée semble indispensable au franchissement des étapes ultérieures de l'activation lymphocytaire T, et notamment à la stimulation des gènes de l'interleukine 2 et de son récepteur.

Georges Bismuth
Alain Trautmann
Patrice Debré

ADRESSES

G. Bismuth : *chargé de recherche*. P. Debré : *professeur*, laboratoire d'immunologie cellulaire et tissulaire, Cnrs URA 0186, CERVI, centre hospitalier Pitié-Salpêtrière, 83, boulevard de l'Hôpital, 75013 Paris, France.
A. Trautmann : *directeur de recherche*, laboratoire de neurobiologie, Cnrs, URA 295, École normale supérieure, 46, rue d'Ulm, 75005 Paris, France.

La régulation du niveau de calcium ionisé dans le cytoplasme est un élément fondamental pour le maintien des fonctions cellulaires.

Ainsi, le fonctionnement normal d'une cellule au repos exige que la concentration intracellulaire de calcium libre, [Ca²⁺]_i, soit maintenue à un niveau très bas, environ dix mille fois inférieur à celui du milieu environnant. Par ailleurs, l'augmentation du calcium intracytoplasmique constitue l'un des moyens par lesquels un signal venu de l'extérieur de la cellule est transformé, *via* un récepteur membranaire, en un message intracellulaire. L'objet de cette synthèse est de faire le point sur les différents mécanismes mis en jeu dans les variations de [Ca²⁺]_i induites dans les lymphocytes T par la stimulation

de molécules dites d'activation, comme le récepteur spécifique pour l'antigène, c'est-à-dire le complexe multimérique CD3/récepteur T (CD3/RcT), ou la molécule de membrane CD2.

Mesure du Ca²⁺ intracellulaire par fluorimétrie

La mesure directe des variations du Ca²⁺ libre intracytoplasmique, c'est-à-dire de l'infime partie du calcium cellulaire total qui n'est ni enfermé dans des organites de stockage ni lié à des protéines cytoplasmiques, n'est possible que depuis peu d'années grâce à l'utilisation d'indicateurs fluorescents du calcium libre. Ces sondes — quin-2, indo-1, fura-2, fluo-3, développées dans le labora-

toire de R.Y. Tsien — sont des dérivés fluorescents de l'EGTA, un chélateur classique du Ca^{2+} [1].

Les raisons pour lesquelles ces sondes sont devenues des outils extrêmement performants pour la biologie cellulaire sont les suivantes :

- Il est possible de les introduire dans les cellules sans endommager ces dernières. En effet, ces molécules peuvent être chimiquement transformées en des analogues possédant des radicaux acétoxy méthylester (AM) qui traversent les membranes cellulaires. Les radicaux AM sont ensuite coupés par des estérases cellulaires. La forme ionisée obtenue, rendue hydrophile par l'hydrolyse, est alors piégée dans la cellule.

- Un signal fluorescent intense au niveau unicellulaire peut être obtenu avec des concentrations de fura-2, d'indo-1 ou de fluo-3 suffisamment faibles (moins de $50 \mu\text{M}$) pour ne pas interférer avec les mécanismes cellulaires de régulation du Ca^{2+} ; on estime ainsi que la concentration intracellulaire de l'ensemble des sites de liaison des protéines liant le Ca^{2+} (calciprotéines) comme la calmoduline, la parvalbumine ou la calcibindine est très supérieure, de l'ordre du millimolaire [2]. L'utilisation de ces sondes à des concentrations faibles permet donc de ne pas modifier le pouvoir tampon de la cellule. Utiliser une sonde dite de première génération comme le quin-2 (environ 30 fois moins brillante que les autres) était plus problématique, puisque cet emploi nécessitait des concentrations très élevées de l'indicateur pour avoir un signal fluorescent d'intensité suffisante.

- La liaison du Ca^{2+} provoque le déplacement du spectre d'excitation du fura-2 (et d'émission de l'indo-1). Pour mesurer, à un moment donné, la valeur absolue du $[\text{Ca}^{2+}]_i$ dans une cellule chargée en fura-2, par exemple, il suffit de connaître à cet instant précis la position du spectre d'excitation du fura-2. Concrètement, on apprécie le déplacement de ce spectre d'excitation en mesurant le rapport des intensités de fluorescence émises pour des excitations successives de la cellule à deux longueurs d'onde distinctes (en général 340 et 380 nm) [3]. Le principe même de la mesure fait que la valeur de $[\text{Ca}^{2+}]_i$

obtenue est indépendante de la concentration de fura-2 dans la cellule, ce qui constitue un avantage décisif de cette méthode.

- Ces indicateurs fluorescents sont très sensibles à des variations de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ autour du niveau de repos habituel (vers 100 nM), du fait que le K_d du Ca^{2+} pour ces chélateurs est de l'ordre de 2 à 300 nM. Enfin, ils discriminent extrêmement bien entre le Ca^{2+} et le Mg^{2+} .

L'augmentation du $[\text{Ca}^{2+}]_i$ au cours de l'activation lymphocytaire T : un phénomène à deux composantes

Des augmentations de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ dans les lymphocytes T, *via* le complexe CD3/TcR ou la molécule CD2, peuvent être induites par des anticorps monoclonaux (AcM) spécifiques de ces molécules AcM, dont la simple fixation à la surface des cellules suffit en général au déclenchement de la réponse calcique [4, 5]. La stimulation de ces récepteurs provoque alors des augmentations de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ dont les caractéristiques dépendent de la présence de Ca^{2+} dans le milieu externe.

La *figure 1* illustre ces variations du $[\text{Ca}^{2+}]_i$ induites dans un clone T humain ou dans la lignée leucémique T Jurkat par un anticorps dirigé contre une des chaînes de la molécule CD3. On peut observer que, même en l'absence de Ca^{2+} extracellulaire, une augmentation faible et transitoire du $[\text{Ca}^{2+}]_i$ se produit. Cela démontre que l'activation déclenche le relargage de Ca^{2+} dans le cytosol à partir de réserves intracellulaires. Cependant, l'augmentation du $[\text{Ca}^{2+}]_i$ est beaucoup plus marquée en présence de Ca^{2+} externe, ce qui suggère que la majeure partie de cette augmentation est liée à l'entrée de Ca^{2+} extracellulaire. Ces deux composants de la réponse calcique vont être maintenant analysés successivement.

Mécanisme de relargage du Ca^{2+} endogène

Les grandes lignes du mécanisme par lequel l'activation des récepteurs CD2

et CD3/TcR aboutit à la libération de Ca^{2+} des réserves intracellulaires sont très similaires à celles observées dans de nombreux autres types cellulaires. En résumé, l'activation de ces récepteurs provoque l'hydrolyse par la phospholipase C (PLC) de phospho-inositides membranaires, dont le phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate (PIP_2), ce qui aboutit à la formation de deux seconds messagers, le diacylglycérol et l'inositol triphosphate (IP_3) [6]. La liaison de l'isomère actif de l' IP_3 , c'est-à-dire (1,4,5) IP_3 , à des récepteurs situés dans la membrane de structures de réserve du calcium (sans doute le réticulum endoplasmique) provoque la sortie de calcium de ces réserves par un canal ionique vraisemblablement situé dans la même molécule que les sites de liaison de l' IP_3 [7]. On note, comme on peut le voir sur la *figure 1*, l'existence d'un délai entre le début de la stimulation et celui de la réponse calcique. Ce délai est typiquement de 20 à 30 secondes lors de la stimulation du complexe CD3/TcR, et de plus d'une minute lorsque l'on stimule la molécule CD2. Il pourrait être lié à l'accumulation nécessaire d'une concentration suffisante d' IP_3 pour déclencher la réponse, avec un effet de seuil.

Plusieurs points sont encore mal connus dans ce schéma. Le couplage récepteur-PLC est en général réalisé dans d'autres types cellulaires par une protéine dite G, car liant le GTP. Cette protéine, de structure hétérotrimérique, a entre autres une fonction d'amplification, et aussi d'intégration, du ou des messages extracellulaires. Curieusement, dans le cas des lymphocytes T, la participation d'une protéine G au phénomène d'activation n'a pas encore été mise en évidence. Certes, des effets inhibiteurs sur le système de la PLC d'une toxine bactérienne, la toxine cholérique, ont été décrits dans le système lymphocytaire T [8, 9]. Cette toxine est capable d'activer irréversiblement certaines protéines G par une réaction dite d'ADP-ribosylation (fixation covalente d'un ADP-ribose sur la sous-unité α de la protéine G). C'est le cas notamment de la protéine G_s , activatrice de l'adénylate cyclase. Cela a pu faire penser à l'existence d'une protéine G

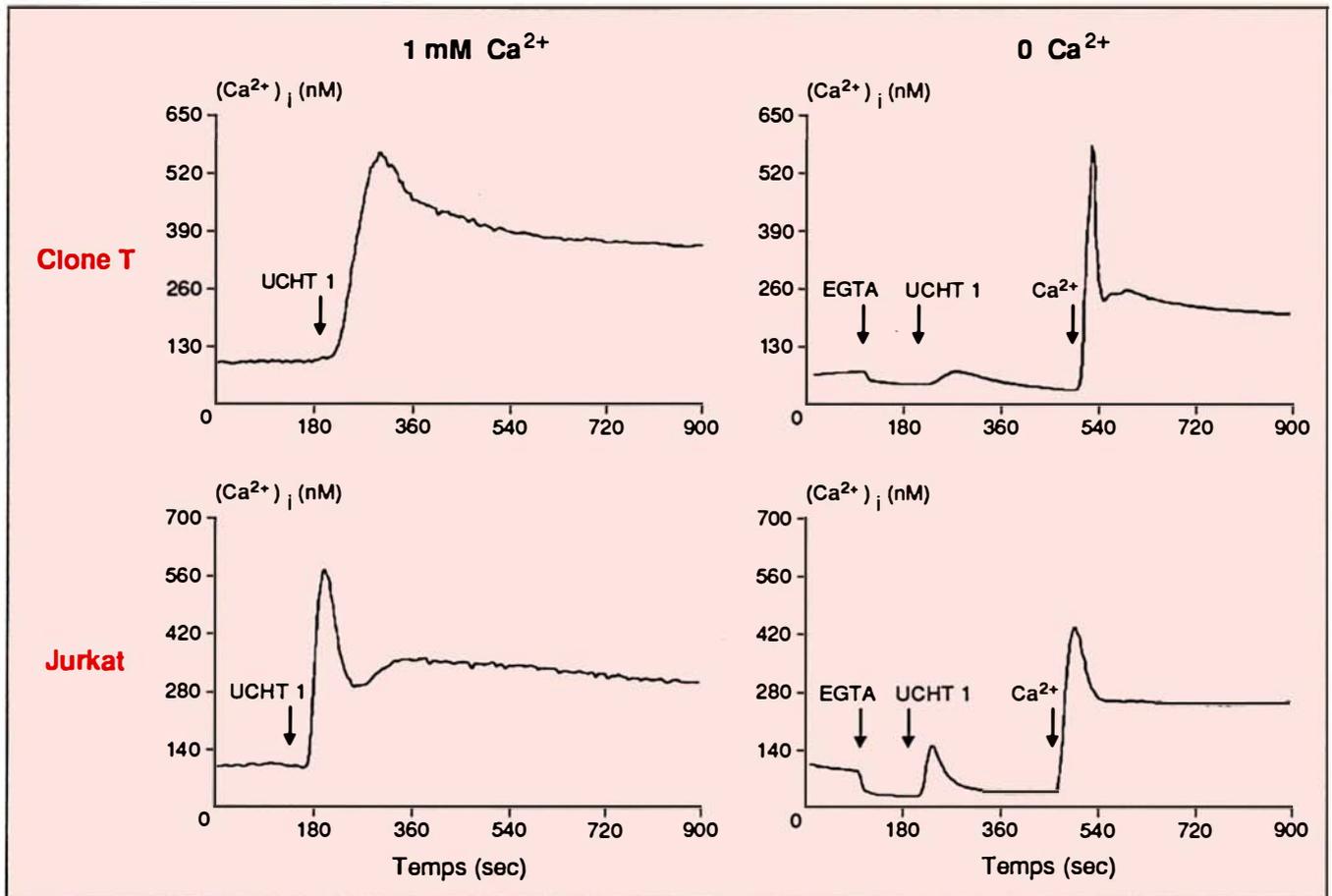


Figure 1. **Profils de l'augmentation de $[Ca^{2+}]_i$, mesurée avec le fura-2 dans un clone T humain $CD4^+$ (en haut) et dans la lignée T Jurkat (en bas), stimulés par UCHT1, un anticorps monoclonal spécifique de la molécule CD3.** La figure montre les résultats obtenus lorsque l'activation est déclenchée dans un milieu contenant 1 mM de Ca^{2+} externe ou dans un milieu déplié en Ca^{2+} par l'addition préalable d'EGTA.

couplée de façon inhibitrice à la PLC dans les cellules T. Il apparaît cependant que beaucoup de ces effets seraient indirects, ayant comme intermédiaire l'AMP cyclique produit par l'activation de l'adénylate cyclase [9, 10].

Un autre débat porte sur l'origine précise du Ca^{2+} relargué. En effet, tous les compartiments de stockage du Ca^{2+} ne sont pas sensibles à l' IP_3 . Le Ca^{2+} contenu dans ces autres compartiments est-il aussi relargué à la suite de la stimulation de ces récepteurs CD2 et CD3 ? C'est fort possible, mais on ignore par quel mécanisme. Le relargage du Ca^{2+} de ce deuxième compartiment dépendrait-il de l' IP_4 [11], du GTP [12], ou de l'augmentation

même de $[Ca^{2+}]_i$, par un phénomène analogue au « *Ca-induced Ca release* » observé dans les cellules musculaires [13] ?

Contrôle de l'entrée de calcium dans la cellule

Canaux ou transporteurs ?

L'entrée de Ca^{2+} (*influx*) déclenchée par l'activation des protéines membranaires CD2 ou CD3/TcR se fait dans le sens du gradient électrochimique du calcium. Elle a donc de fortes chances de dépendre de l'ouverture de canaux ioniques.

En combinant les techniques de microfluorométrie (par le fura-2) et le *patch-clamp* (électrophysiologie moléculaire), Lewis et Cahalan ont montré

que dans les lymphocytes T activés par une lectine mitogénique, la phytohémagglutinine (PHA), l'entrée de Ca^{2+} pouvait être très bien corrélée à un courant entrant de très faible amplitude, vraisemblablement dû à cet *influx* de calcium, mais au sein duquel il n'était pas possible de distinguer d'ouvertures et de fermetures de canaux ioniques [14]. Un résultat similaire avait été décrit précédemment dans les mastocytes [15]. Cela signifie que l'entrée du calcium passe soit par des canaux de conductance trop faible ($< 0,1$ pico siemens) pour pouvoir être mesurée directement à l'heure actuelle, ou bien par un transporteur, hypothèse moins probable mais qu'on ne peut totalement exclure. Par souci de simplicité,

nous continuerons à parler de canaux dans ce qui suit.

Ce courant de faible amplitude peut-il rendre compte de l'augmentation de $[Ca^{2+}]_i$ observée ? On peut calculer qu'un courant calcique de quelques picoampères pendant quelques minutes peut parfaitement faire entrer dans la cellule suffisamment de calcium pour faire augmenter le $[Ca^{2+}]_i$ de plusieurs centaines de nM, même en tenant compte du fait que sur cent ou même mille ions Ca^{2+} entrant dans la cellule, un seul restera sous forme ionisée, les autres allant se lier à des protéines tampons du cytosol.

Il existe d'autres études, fréquemment citées, où ont été décrits des

canaux ioniques qui, selon leurs auteurs, pourraient être impliqués dans l'augmentation de $[Ca^{2+}]_i$ observée dans des lymphocytes T activés [16, 17]. Ces études ne comportaient pas de mesure simultanée des variations de $[Ca^{2+}]_i$; il n'y avait donc pas d'indications formelles permettant d'affirmer que les canaux observés jouaient un rôle dans l'augmentation de $[Ca^{2+}]_i$. Il nous paraît donc prudent de dire, même si cette conclusion est controversée, que personne n'a encore montré de courants associés à l'ouverture de canaux ioniques individuels et qui soient responsables de l'entrée de Ca^{2+} dans les lymphocytes T activés.

Effet du potentiel de membrane

Ces canaux ne sont pas des canaux calciques activés par la dépolarisation, du type de ceux que l'on trouve notamment dans la membrane de cellules nerveuses ou musculaires. Dans ces cellules dites excitables, une dépolarisation de la membrane provoque l'ouverture de canaux, ce qui entraîne une entrée de calcium, manifestée par un courant entrant et une augmentation de $[Ca^{2+}]_i$. On parle alors de canaux sensibles au potentiel, ou « voltage-dépendants ».

Rien de tel n'est observé dans les lymphocytes T où un saut de potentiel dépolarisant ne déclenche ni courant entrant ni augmentation de $[Ca^{2+}]_i$. Au contraire, la dépolarisation d'un lymphocyte T pendant la phase d'augmentation soutenue de $[Ca^{2+}]_i$ qui suit l'activation, *via* le CD3 par exemple, provoque une diminution de $[Ca^{2+}]_i$, sans doute explicable par le fait que, si le nombre de canaux ouverts n'est pas affecté par la dépolarisation, le gradient électrochimique des ions Ca^{2+} , lui, est diminué par la dépolarisation (figure 2).

Blocage de l'influx de calcium

Cette sensibilité au potentiel de l'influx de Ca^{2+} , que nous venons de mentionner, peut avoir d'importantes conséquences pharmacologiques. Ainsi, l'on sait que différents bloquants des canaux K^+ peuvent inhiber la prolifération ou la différenciation des lymphocytes T [18, 20]. Il pouvait être envisagé qu'un des effets de ces agents bloquants des canaux K^+ était de dépolariser la membrane lymphocytaire, entraînant alors une diminution de l'entrée de Ca^{2+} , et donc du niveau de $[Ca^{2+}]_i$, au cours de la stimulation. Nous avons vérifié l'exactitude de cette hypothèse en étudiant les effets de la nitrendipine. Cette dihydropyridine est un bloquant classique des canaux calcium voltage-dépendants déjà mentionnés. L'existence d'effets inhibiteurs de ce composé sur l'entrée de Ca^{2+} dans les lymphocytes T [21] a donc fait penser à l'existence dans les lymphocytes T de canaux calciques,

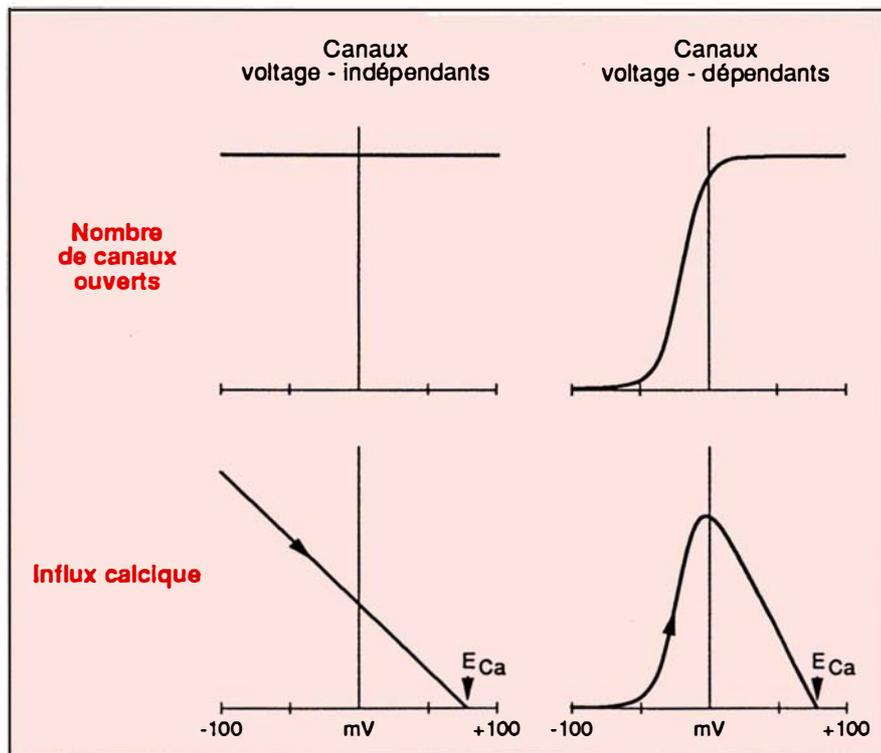


Figure 2. Rôle du potentiel de membrane sur l'ouverture des canaux calciques voltage-dépendants et voltage-indépendants et sur l'influx de calcium à travers ces canaux. Pour les canaux insensibles au potentiel (colonne de gauche), le nombre de canaux ouverts est indépendant du potentiel de membrane. Plus le potentiel de membrane est négatif (hyperpolarisation), plus le flux entrant de Ca^{2+} dans la cellule est grand (E_{Ca}), et, inversement, aux potentiels de membrane positifs (dépolarisation) correspond une diminution de ce flux entrant. Pour les canaux sensibles au potentiel (colonne de droite), le nombre de canaux ouverts est au contraire dépendant du potentiel de membrane, en l'occurrence il croît avec la dépolarisation. Mais aux potentiels hyperpolarisés, ces canaux étant fermés, l'influx de Ca^{2+} diminue au lieu de croître. Les flèches indiquent l'effet de la dépolarisation sur l'influx de Ca^{2+} dans les deux cas de figure.

RÉFÉRENCES

1. Tsien RY. Fluorescent probes of cell signalling. *Ann Rev Neurosci* 1989 ; 12 : 227-53.
2. Johansson JS, Haynes DH. Deliberate Quin2 overload as a method for *in situ* characterization of active calcium extrusion systems and cytoplasmic calcium binding : application to the human platelet. *J Membrane Biol* 1988 ; 104 : 147-63.
3. Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 1985 ; 260 : 3440-50.
4. Weiss A, Imboden J, Shoback J, Stobo J. Role of T3 surface molecules in human T-cell activation : T3-dependent activation results in an increase in cytoplasmic free calcium. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984 ; 81 : 4269-73.
5. Alcover A, Weiss M, Daley JF, Reinherz EL. The T11 glycoprotein is functionally linked to a calcium channel in precursor and mature T-lineage cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986 ; 83 : 2614-8.
6. Guillemette G. Messagers intracellulaires produits par la phospholipase C. *médecine-sciences* 1989 ; 5 : 570-4.
7. Furuichi T, Yoshikawa S, Miyawaki A, Wada K, Maeda N, Mikoshiba K. Primary structure and functional expression of the inositol 1,4,5-triphosphate-binding protein P_{400} . *Nature* 1989 ; 342 : 32-8.
8. Imboden J, Shoback DM, Pattison G, Stobo JD. Cholera toxin inhibits the T-cell antigen receptor-mediated increases in inositol triphosphate and cytoplasmic free calcium. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986 ; 83 : 5673-7.
9. Lerner A, Jacobson B, Miller RA. Cyclic AMP concentrations modulate both calcium flux hydrolysis of phosphatidylinositol phosphates in mouse T-lymphocytes. *J Immunol* 1988 ; 140 : 936-40.
10. Bismuth G, Theodorou I, Gouy H, Le Gouvello S, Debré P. Cyclic AMP-mediated alteration of the CD2 activation process in human T-lymphocytes. Preferential inhibition of the phosphoinositide cycle-related transduction pathway. *Eur J Immunol* 1988 ; 18 : 1351-7.
11. Hill TD, Dean NM, Boynton AL. Inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate induces Ca^{2+} sequestration in rat liver cells. *Science* 1988 ; 242 : 1176-8.
12. Ghosh TK, Mullaney JM, Tarazy FI, Gill D. GTP-activated communication between distinct inositol 1,4,5-triphosphate-sensitive and -insensitive calcium pools. *Nature* 1989 ; 340 : 236-40.
13. Fabiato A. Time and calcium dependence of activation and inactivation of calcium-induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of a skinned canine cardiac Purkinje cell. *J General Physiol* 1985 ; 85 : 247-89.
14. Lewis RS, Cahalan MD. Mitogen-induced oscillations of cytosolic Ca^{2+} and transmembrane Ca^{2+} current in human leukemic T cells. *Cell Regulation* 1989 ; 1 : 99-112.
15. Penner R, Matthews G, Neher E. Regulation of calcium influx by second messengers in rat mast cells. *Nature* 1988 ; 334 : 499-504.
16. Kuno MJ, Goronzy J, Weyand CM, Gardner P. Single-channel and whole-cell recordings of mitogen-regulated inward currents in human cloned helper T-lymphocytes. *Nature* 1986 ; 323 : 269-73.
17. Gardner P, Alcover A, Kuno M, *et al.* Triggering of T-lymphocytes via either T3-Ti or T11 surface structures opens a voltage-insensitive plasma membrane calcium-permeable channel : requirement for interleukin-2 gene function. *J Biol Chem* 1989 ; 264 : 1068-76.
18. Oettgen HC, Terhorst C, Cantley LC, Rosoff PM. Stimulation of the T3-T cell receptor complex induces a membrane-potential sensitive calcium influx. *Cell* 1985 ; 40 : 583-90.
19. Decoursey TE, Chandy KG, Gupta S, Calahan MD. Voltage gated K^{2+} channels in human T-lymphocytes : a role in mitogenesis. *Nature* 1984 ; 307 : 465-71.
20. Grinstein S, Dixon SJ. Ion transport, membrane potential, and cytoplasmic pH in lymphocytes : changes during activation. *Physiological Reviews* 1989 ; 69 : 417-81.
21. Kimball PM, Gamaz N, Sell S. Two episodes of calcium uptake associated with T lymphocyte activation. *Cell Immunol* 1988 ; 113 : 107-16.

insensibles certes au potentiel, mais également blocables par les dihydropyridines. Nous avons montré qu'en réalité l'une des cibles de la nitrendipine dans les lymphocytes T était constituée par les canaux K^{+} , et que la conséquence de leur blocage était en premier lieu la dépolarisation de la cellule, entraînant indirectement l'inhibition de l'influx de Ca^{2+} [22]. On notera que les seuls bloquants directs de ces canaux qui soient connus à l'heure actuelle sont des cations bi- ou trivalents (Ni^{2+} , Cd^{2+} , Mn^{2+} , La^{3+}).

Le flux entrant de calcium dépend d'un second messenger

L'existence d'un délai de plusieurs dizaines de secondes entre l'activation de récepteurs membranaires et l'influx de calcium constitue une indication forte que les canaux responsables de ce flux entrant sont activés par un second messenger et non à la suite d'une interaction directe avec le récepteur membranaire.

On ignore encore la nature de ce second messenger. Von Tscharner *et al.* [23] avaient proposé que dans les neutrophiles, ce puisse être le calcium lui-même, impliqué donc dans une rétroaction positive. Il semble en réalité que l'effet direct de l'augmentation de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ soit de diminuer l'entrée de $[\text{Ca}^{2+}]_i$, peut-être en inactivant les canaux membranaires perméables au Ca^{2+} , en tout cas en exerçant une rétroaction négative. Cela n'exclut pas le fait qu'une augmentation initiale de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ puisse, en activant des enzymes sensibles au Ca^{2+} , être indirectement impliquée dans l'ouverture de canaux calciques membranaires.

L' IP_3 est actuellement considéré par beaucoup comme l'un des meilleurs candidats au rôle d'activateur des canaux calciques de la membrane plasmique. L' IP_3 contrôlerait ainsi, et le relargage de Ca^{2+} depuis les stocks intracellulaires, et son entrée dans la cellule. Cela pourrait expliquer, par exemple, que l'arrêt de l'activation entraîne à la fois la baisse de la production d' IP_3 et la disparition de l'influx de Ca^{2+} [24]. Mais ces deux faits pourraient également être simplement coïncidents. Si l' IP_3

contrôle aussi le flux entrant de Ca^{2+} , on devrait trouver des sites de liaison de l' IP_3 au niveau de la membrane plasmique. C'est ce qui a été effectivement observé dans certains types cellulaires [25], mais pas dans d'autres [26].

En faveur de l'« hypothèse IP_3 » plaident également les observations du groupe de Gardner, montrant que l' IP_3 peut activer des canaux ioniques, directement, dans des fragments de membrane arrachés à des lymphocytes T [27]. Mais l'ouverture de ces canaux ioniques n'a pas été observée sur des cellules entières, où l'augmentation de $[Ca^{2+}]_i$ avait bel

et bien lieu, ainsi que l'ont montré Lewis et Cahalan dans les lymphocytes [14], et Penner *et al.* [15] dans les mastocytes.

Par ailleurs, ces derniers auteurs ont observé que l'injection d' IP_3 dans leurs cellules déclenchait l'apparition du petit courant entrant décrit plus haut (sans ouverture de canaux apparente), ce qui pourrait être en faveur de l'hypothèse IP_3 . Mais, sachant que l' IP_3 provoque également une augmentation de $[Ca^{2+}]_i$ à la suite du relargage de Ca^{2+} des stocks intracellulaires, on ne peut dans une telle expérience distinguer un rôle direct de l' IP_3 d'un effet indirect

par l'intermédiaire des protéines sensibles au calcium. On ne peut donc considérer comme démontré que c'est l' IP_3 qui active les canaux calciques de la membrane plasmique.

D'autres faits vont à l'encontre de cette hypothèse. Ainsi, on sait qu'il est possible d'activer le flux entrant de Ca^{2+} sans qu'il y ait production décelable d' IP_3 . Cela a pu être démontré récemment grâce à la thapsigargine, une lactone sesquiterpène. Cette molécule est capable d'inhiber la pompe calcique du réticulum endoplasmique et de vider les stocks intracellulaires de Ca^{2+} sensibles à l' IP_3 [28]. La thapsigargine provoque également dans certains types cellulaires, dont les lymphocytes T et les macrophages, un influx de Ca^{2+} [29]. Tout cela se passe sans production d' IP_3 , qui ne semble donc pas être absolument nécessaire à l'ouverture de canaux calciques dans la membrane plasmique.

Relargage et flux entrant de calcium sont deux phénomènes liés

Bien que la libération de Ca^{2+} à partir de réserves intracellulaires et l'entrée de Ca^{2+} dans la cellule mettent en jeu des structures distinctes, ces deux phénomènes n'apparaissent pas pour autant indépendants l'un de l'autre.

Ainsi, l'influx de Ca^{2+} pourrait, en induisant une augmentation du Ca^{2+} , accélérer le relargage qui dépend au départ de l'activité de la PLC, cette enzyme pouvant être sensible à la concentration de Ca^{2+} intracytoplasmique [30]. En outre, il semble que le relargage de calcium des stocks intracellulaires ne soit pas seulement un phénomène précoce, mais puisse, au moins dans certains cas, avoir lieu lors de la deuxième phase de la réponse calcique, en même temps que l'entrée de Ca^{2+} . Par exemple, dans la lignée cellulaire T Jurkat stimulée par la PHA, on peut observer des oscillations maintenues du niveau de $[Ca^{2+}]_i$, avec une pseudopériode de l'ordre de 1 à 2 minutes [14]. Des oscillations similaires ont été obtenues dans d'autres types cellulaires et ont fait l'objet de nombreux commentaires et hypothèses [31, 32]. Elles semblent

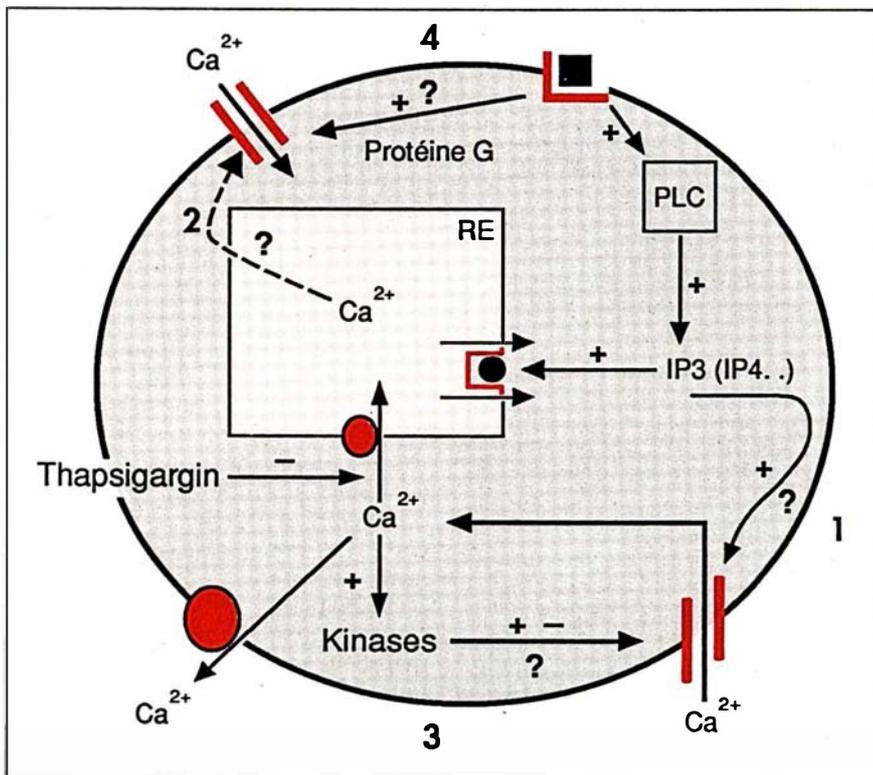


Figure 3. **Schéma général des différentes hypothèses émises pour l'influx de Ca^{2+} .** L'hypothèse « phospho-inositides » (1) privilégie un rôle pour l' IP_3 (et éventuellement l' IP_4), produit par l'activation de la PLC, sur l'entrée de calcium dans la cellule, et ce en plus de son action sur la mobilisation des stocks de Ca^{2+} intracellulaires. L'hypothèse « modèle capacitif » (2) fait de la déplétion préalable (ou concomitante) des stocks de Ca^{2+} intracellulaires du réticulum endoplasmique (RE) (sans doute via l' IP_3), l'élément déclenchant du flux entrant, par un mécanisme inconnu. Des inhibiteurs de la pompe calcique du réticulum endoplasmique (comme la thapsigargine) provoquant la vidange des pools calciques, permettent d'étudier cette hypothèse. L'hypothèse « enzymes Ca^{2+} -dépendants » (3) suppose l'activation, par l'augmentation initiale de $[Ca^{2+}]_i$, d'enzymes (calmoduline, phospholipase A2, protéine kinase C) capables d'agir sur le flux entrant. (4) L'existence d'une relation plus directe (peut-être par une protéine G) entre le récepteur stimulé et la structure membranaire responsable de l'influx n'est pas exclue.

RÉFÉRENCES

22. Radriamanpita C, Bismuth G, Debré P, Trautmann A. Nitrendipine inhibition of the influx of calcium in T-lymphocytes is mediated by cell depolarization. Soumis à publication.
23. Von Tscharner V, Prod'hom B, Baggiolini M, Reuter H. Ions channels in human neutrophils activated a rise in free cytosolic calcium concentrations. *Nature* 1986 ; 324 : 369-72.
24. Imboden JB, Weiss A. The T-cell antigen receptor regulates sustained increases in cytoplasmic free Ca^{2+} through extracellular Ca^{2+} influx and ongoing intracellular Ca^{2+} mobilization. *Biochem J* 1987 ; 247 : 695-700.
25. Guillemette G, Balla T, Baukal AJ, Catt KJ. Characterization of inositol 1,4,5-triphosphate receptor and calcium mobilization in a hepatic plasma membrane fraction. *J Biol Chem* 1988 ; 263 : 4541-8.
26. Ross CA, Meldolesi J, Milner TA, Satoh T, Supattapone S, Snyder SH. Inositol 1,4,5-triphosphate receptor localized to endoplasmic reticulum in cerebellar Purkinje neurons. *Nature* 1989 ; 339 : 468-70.
27. Kuno M, Gardner P. Ions channels activated by inositol 1,4,5-triphosphate in plasma membrane of human T-lymphocytes. *Nature* 1987 ; 326 : 301-4.
28. Thastrup O, Dawson AP, Scharff O, et al. Thapsigargin, a novel molecular probe for studying intracellular calcium release and storage. *Agents and Actions* 1989 ; 27 : 17-23.
29. Sharff O, Foder B, Thastrup O, et al. Effect of thapsigargin on cytoplasmic Ca^{2+} and proliferation of human lymphocytes. *Biochim Biophys Acta* 1988 ; 972 : 257-64.
30. Bonvini E, Debell KE, Kolber MA, Hoffman T, Hodes RJ, Taplits MS. Hydrolysis of inositol phospholipids induced by stimulation of the T-cell antigen receptor complex in antigen-specific, murine helper T-cell clones. Requirement for exogenous calcium. *J Immunol* 1989 ; 143 : 587-95.
31. Rink TJ, Hallam TJ. Calcium signalling in non excitable cells : notes on oscillations and store refilling. *Cell Calcium* 1989 ; 10 : 385-7.
32. Berridge MJ, Irvine RF. Inositol phosphates and cell signalling. *Nature* 1989 ; 341 : 197-205.
33. Irvine RF, Moore RM. Micro-injection of inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate activates sea urchin eggs by a mechanism dependent of external Ca^{2+} . *Biochem J* 1986 ; 240 : 917-20.
34. Changya L, Gallacher DV, Irvine RF, Potter BVL, Petersen OH. Inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate is essential for sustained activation of the Ca^{2+} -dependent K^{2+} current in single internally perfused mouse lacrimal acinar cells. *J Membrane Biol* 1989 ; 109 : 85-93.
35. Matthews G, Neher E, Penner R. Second messengers-activated calcium influx in rat peritoneal mast cells. *J Physiol* 1989 ; 418 : 105-30.
36. Putney JW. A model for receptor regulated calcium entry. *Cell Calcium* 1986 ; 7 : 1-12.
37. Takemura H, Hughes AR, Thastrup O, Putney JW. Activation of calcium entry by the tumor promotor thapsigargin in parotid acinar cells. *J Biol Chem* 1989 ; 264 : 12226-71.
38. Le Gouvello S, Collard O, Theodorou I, Bismuth G, Tarantino N, Debré P. CD2 stimulates a phospholipase A2 activity in human T-lymphocytes : role of extracellular calcium. *J Immunol* 1990 ; 144 : 2359-64.
39. Theodorou I, Boumsell L, Calvo CF, Merle Beral H, Gouy H, Debré P. CD1 stimulation of human T-cell lines induces a rapid increase in the intracellular free Ca^{2+} concentration and the production of IL2. *J Immunol* 1990 ; 144 : 2518-23.
40. Roifman CM, Mills GM, Cheung RK, Gelfand EW. Mitogenic response of human thymocytes : identification of functional Ca^{2+} -dependent and independent signals. *Clin Exp Immunol* 1986 ; 66 : 139-49.
41. Sussman JJ, Mercep M, Saito T, Germain RN, Bonvini E, Ashwell JD. Dissociation of phosphoinositides hydrolysis and Ca^{2+} fluxes from the biological responses of a T-cell hybridoma. *Nature* 1988 ; 334 : 625-8.
42. Gelfand EW, Cheung RK, Mills GB, Grinstein S. Uptake of extracellular Ca^{2+} and not recruitment from internal stores is essential for T-lymphocyte proliferation. *Eur J Immunol* 1988 ; 18 : 917-22.
43. Goldsmith MA, Weiss A. Early signal transduction by the antigen receptor without commitment to T-cell activation. *Science* 1988 ; 240 : 1029-31.

dues au vidage-remplissage de réserves intracellulaires, et ne dépendre ni de variations de la concentration d' IP_3 , ni de variations du potentiel de membrane des cellules. On peut se demander si ces oscillations ont un rôle dans le contrôle de l'influx de Ca^{2+} .

Par ailleurs, il existe de nombreuses indications suggérant que le flux entrant de Ca^{2+} est tributaire du relargage initial. Pour expliquer ce deuxième type de relation, il n'existe pas de certitude, mais plusieurs hypothèses.

L'une d'entre elles attribue à l' IP_3 , on l'a vu, le double rôle de provoquer relargage et *influx*. Cette hypothèse « phospho-inositides » possède cependant une variante, où l'(1,4,5,6) IP_4 , produit de phosphorylation de l' IP_3 , serait responsable de l'entrée de Ca^{2+} . Cette hypothèse, fondée sur des résultats obtenus dans les œufs d'oursin [33] et des glandes exocrines [34], est très controversée et n'a pas été confirmée dans les cellules sanguines [35].

Toujours dans le but d'expliquer la relation existant entre relargage et flux entrant de Ca^{2+} , Putney a proposé un modèle, le « modèle capacitif » [36]. Dans la version initiale de ce modèle, les canaux de la membrane plasmique ne s'ouvriraient pas sur le cytosol, mais directement sur les réserves intracellulaires. Un canal de type *gap-junction* permettrait au Ca^{2+} de franchir la double membrane résultant de l'apposition en certains points de la membrane du réticulum avec la membrane plasmique. Selon Putney, ce serait la déplétion en Ca^{2+} des réserves intracellulaires qui constituerait le signal de déclenchement de l'*influx*. Cela assurerait une parfaite synchronisation des deux phénomènes. Ce modèle, assez populaire sans doute parce qu'il est satisfaisant d'un point de vue finaliste, ne repose pas sur des bases expérimentales très solides. D'ailleurs Putney lui-même est revenu récemment, dans une étude utilisant la thapsigargine, sur certains des aspects de ce modèle capacitif, se contentant de réaffirmer que le niveau de remplissage des stocks intracellulaires pourrait influencer, sans doute indirectement, l'*influx* de Ca^{2+} [37].

Nous avons déjà mentionné une

autre façon plausible d'expliquer la relation entre relargage de Ca^{2+} et flux entrant, qui mettrait en jeu des enzymes activées par l'augmentation initiale du $[\text{Ca}^{2+}]_i$ comme la calmoduline, la phospholipase A2 ou la protéine kinase C [38]. Ce type d'hypothèse, encore peu développé, pourrait rendre compte du fait qu'une augmentation brève de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ provoquée par l'ionophore calcique A23187 déclenche une entrée de Ca^{2+} dans des macrophages (A. Trautmann, C. Randriamampita, résultats non publiés).

Conclusion

L'activation des lymphocytes T par des lectines ou des anticorps monoclonaux spécifiques des molécules CD3/TcR ou CD2 est étroitement associée à une augmentation précoce de $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Cette augmentation, également déclenchée par la stimulation d'autres molécules présentes à la surface des cellules T [39], est-elle nécessaire et suffisante à l'activation des lymphocytes ?

Elle n'est certainement pas suffisante, puisque certaines lectines comme le WGA (*wheat germ agglutinin*) provoquent bien une augmentation de $[\text{Ca}^{2+}]_i$, alors qu'elles ne sont pas mitogéniques [40]. Elle semble cependant nécessaire puisque la prolifération de lymphocytes, induite par exemple par des lectines comme la PHA, n'a pas lieu dans un milieu sans calcium ou en présence de substances bloquant l'entrée de calcium [20].

La prolifération des lymphocytes T est déclenchée par l'action autocrine de l'interleukine 2 (IL2) sur son récepteur. Les agents mitogènes produisent en fait deux signaux essentiels, qui sont indispensables à la production d'IL2 et à l'expression de son récepteur. Il semble clair que la production d'IL2 requiert l'augmentation de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ [17]. Récemment pourtant, Sussman *et al.* [41] ont décrit un hybridome T murin où l'activation du récepteur T (TcR) ne provoque ni augmentation de l' IP_3 , ni augmentation précoce de $[\text{Ca}^{2+}]_i$, et pourtant les cellules stimulées produisent de l'IL2. L'augmentation de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ n'aurait-elle pas de rôle dans le déclenchement de la réponse ? Il

se pourrait qu'en réalité l'augmentation transitoire initiale due au relargage du Ca^{2+} ait peu d'importance, et que ce qui importe soit le flux entrant soutenu de Ca^{2+} qui lui fait suite [42] (Sussman *et al.* n'avaient examiné que la réponse précoce). En effet, Goldsmith et Weiss [43] ont montré qu'un variant de la lignée T Jurkat ne produisait pas d'IL2 en réponse à des mitogènes. Dans cette lignée, la stimulation par un anticorps monoclonal anti-CD3 provoquait la formation d' IP_3 et le relargage de Ca^{2+} , mais il n'y avait pas ensuite d'*influx* prolongé de Ca^{2+} et donc pas d'augmentation soutenue de $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

En résumé, les agents mitogéniques déclenchent tous une augmentation de $[\text{Ca}^{2+}]_i$, résultat d'abord d'un relargage de Ca^{2+} de stocks internes, où l' IP_3 joue vraisemblablement le rôle de second messenger. On ignore la fonction de cette augmentation transitoire de $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Elle est suivie d'une augmentation soutenue de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ due à l'entrée massive de Ca^{2+} extracellulaire dans la cellule, sans doute *via* des canaux ioniques dont les caractéristiques et le mode d'activation restent à déterminer. Cette entrée de Ca^{2+} semble nécessaire à la production de l'IL2 et contribue donc au déclenchement de la prolifération cellulaire ■

TIRÉS A PART

G. Bismuth.

Summary

Calcium and T lymphocyte activation

Activation of human T lymphocytes *via* the CD3/T cell-antigen receptor or the CD2 cell surface molecule triggers a prolonged increase in intracytoplasmic free calcium concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$). This calcium response has two components, one is Ca^{2+} mobilization from intracellular stores and the second results from the entry of Ca^{2+} from extracellular spaces. The mobilization phase is responsible of a transient Ca^{2+} peak still observable in Ca^{2+} -free medium. Phosphorylated derivatives of inositol phosphate, mainly (1,4,5) IP_3 , produced by activation of phospholipase C by the T cell agonists, are predictably the second messengers for this phase. Cell surface Ca^{2+} permeant structures are involved in the sustained increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$. They are presumably voltage-independent Ca^{2+} channels. Cell depolarization inhibits the Ca^{2+} influx by a reduction of the inwardly directed electrical driving force on Ca^{2+} , a finding which explains in lymphocytes most of the effects on $[\text{Ca}^{2+}]_i$ of drugs such as K^+ channel blockers, but also dihydropyridines. It is not known whether inositol phosphate second messengers activate these channels, however a Ca^{2+} influx in human T cells can be induced by thapsigargin, independently of the PLC pathway. There is a close relation between mobilization of intracellular Ca^{2+} pool(s) and Ca^{2+} entry into human T lymphocytes. Activation of the Ca^{2+} influx is apparently coordinated with the extent of depletion of intracellular Ca^{2+} pool(s) and with the resulting initial rise in $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Therefore, one main function of the early (1,4,5) IP_3 -dependent increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ together with the depletion of Ca^{2+} stores, may be to trigger the Ca^{2+} influx which follows.