



HAL
open science

Caractérisation des canaux calciques dans les polynucléaires neutrophiles : rôle dans la phagocytose et la production des radicaux libres oxygénés

Alaeddine Djillani

► **To cite this version:**

Alaeddine Djillani. Caractérisation des canaux calciques dans les polynucléaires neutrophiles : rôle dans la phagocytose et la production des radicaux libres oxygénés. Sciences agricoles. Université Paris Sud - Paris XI, 2013. Français. NNT : 2013PA11T056 . tel-01069097

HAL Id: tel-01069097

<https://theses.hal.science/tel-01069097>

Submitted on 27 Sep 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



UNIVERSITE PARIS - SUD

**LABORATOIRE INSERM UMRS-757 SIGNALISATION CALCIQUE ET
INTERACTIONS CELLULAIRES DANS LE FOIE BATIMENT 443**

FACULTE DES SCIENCES D'ORSAY

UNIVERSITE PARIS-SUD

**ECOLE DOCTORALE : SIGNALISATIONS ET RESEAUX
INTEGRATIFS EN BIOLOGIE ED419**

DISCIPLINE : PHARMACOLOGIE, BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLECULAIRE

T H E S E D E D O C T O R A T E N S C I E N C E S

**CARACTERISATION DES CANAUX CALCIQUES DANS
LES POLYNUCLEAIRES NEUTROPHILES : ROLE DANS
LA PHAGOCYTOSE ET LA PRODUCTION DES
RADICAUX LIBRES OXYGENES**

SOUTENUE LE 26 SEPTEMBRE 2013

PAR

ALAEDDINE DJILLANI

DEVANT UN JURY COMPOSE DE :

DIRECTEUR DE THESE : PR. OLIVER NÜßE

UNIVERSITE PARIS-SUD

CO-DIRECTEUR DE THESE : DR. OLIVIER DELLIS

UNIVERSITE PARIS-SUD

RAPPORTEURS : DR. SABRINA BRECHARD

UNIVERSITE DU LUXEMBOURG

DR. THIERRY CAPIOD

INSERM U845

EXAMINATEURS : DR. GRÉGOIRE VANDECASTEELE

INSERM UMR-S 769 - LABEX LERMIT

PR. MARC LE MAIRE

UNIVERSITE PARIS-SUD

REMERCIEMENTS

J'aimerais remercier Sabrina Bréchar, Marc Le Maire, Grégoire Vandecasteele et Thierry Capiod d'avoir accepté faire partie de mon Jury de thèse.

Je remercie également mes deux directeurs de thèse Oliver Nüsse et Olivier Dellis d'avoir supervisé mon travail de thèse, pour leur soutien, leurs conseils et aussi leur disponibilité.

Je remercie Laurent Combettes de m'avoir accueilli dans son laboratoire ainsi que tout le personnel du laboratoire INSERM-757 pour leur soutien et encouragements.

Je remercie Kim, Jacky, Laurence, Sophie et les autres pour leur soutien et leur générosité.

Un grand merci à toute ma famille en Algérie, plus particulièrement mes parents qui m'ont toujours encouragé et aidé à surmonter des épreuves difficiles au cours de mes trois années de thèse.

Enfin un grand merci bien sur à ma femme Layla qui a fait preuve d'une grande patience et qui m'a énormément aidé et soutenu durant toute ma thèse.

RESUME

Les polynucléaires neutrophiles représentent 50-70% des leucocytes sanguins et possèdent un rôle majeur dans la défense de l'organisme contre les pathogènes. Le Ca^{2+} est un second messager qui joue un rôle primordial dans le chimiotactisme, la phagocytose, la dégranulation et la production de formes réactives de l'oxygène (FRO) afin de neutraliser l'agent pathogène. Dans ces cellules, l'influx calcique de type SOCE est essentiel pour l'homéostasie calcique. Il est peu étudié en raison du manque d'outils pharmacologiques spécifiques d'où l'importance dans un premier temps de chercher de nouvelles molécules. Les cellules T Jurkat dont le SOCE est largement caractérisé servent de modèle pour la caractérisation initiale de ces molécules.

Le 2-APB est parmi les molécules les plus largement utilisées dans la caractérisation du SOCE en raison de sa double activité sur le SOCE avec une potentialisation à [1-10 μM] et une inhibition à [$> 20 \mu\text{M}$]. En revanche, ce produit manque de spécificité et agit sur d'autres cibles cellulaires comme les récepteurs à l'inositol (1,4,5)-trisphosphate (InsP_3Rs). La 1^{ère} étape est de sélectionner à partir d'analogues commerciaux du 2-APB (Methoxy-APB, Dimethoxy-APB, Cyclic-APB, Benzothienyl-APB, Thienyl-APB et MDEB), des composés plus spécifiques et également plus efficaces que la molécule mère. Deux molécules se sont distinguées : le MDEB comme uniquement potentialisant du SOCE et le Benzothienyl-APB comme un puissant inhibiteur. En revanche, tous les analogues du 2-APB inhibent les InsP_3Rs à l'exception du MDEB qui semble plus spécifique du SOCE. L'effet du MDEB sur le courant calcique, I_{CRAC} , a été étudié grâce à la technique du patch-clamp. Il augmente d'environ 4 fois l'amplitude de I_{CRAC} par rapport à celle enregistrée dans les cellules contrôle. Par ailleurs, le MDEB ralentit l'inactivation rapide de I_{CRAC} due au Ca^{2+} .

Sur le plan physiologique, le MDEB à des concentrations croissantes inhibe la synthèse de l'IL-2 dans les cellules Jurkat stimulées et ceci malgré son effet potentialisant du SOCE. Cette activité est liée à son effet pro-apoptotique dans les cellules Jurkat stimulées.

Le MDEB et le Benzothienyl-APB caractérisés dans la 1^{ère} partie nous ont servi d'outils potentiels afin d'étudier le SOCE des cellules PLB-985 différenciées en cellules proches de neutrophiles. Le SOCE a été induit soit par un traitement des cellules avec la thapsigargine (Tg) soit de manière physiologique avec les peptides fMLF et le WKYMVm deux chimioattractants, ligands des récepteurs aux peptides formylés FPR et FPRL1 respectivement. En plus, le SOCE induit par la Tg est modulable par le 2-APB, potentialisé par le MDEB et inhibé par le Benzothienyl-APB.

La phagocytose des levures par les cellules PLB-985 différenciées ainsi que la production de FRO intraphagosomales ont été inhibées par le MDEB et le Benzothienyl-APB. Les FRO extracellulaires ont été également inhibées par Benzothienyl-APB en revanche à cause de la forte interférence du MDEB avec la technique de mesure nous n'avons pas pu étudier ses activités.

En conclusion, le MDEB et le Benzothienyl-APB sont de nouveaux outils pharmacologiques potentialisant ou inhibant le SOCE des leucocytes, qui nous permettront dans l'avenir une meilleure compréhension de l'entrée calcique et ses rôles dans ces cellules.

SUMMARY

Neutrophils represent 50-70% of human blood leukocytes; their role is to protect the body against pathogens. Calcium is a second messenger which plays an important role in chemotaxis, phagocytosis, degranulation and the production of reactive oxygen species (ROS) in order to eliminate microbes. In neutrophils, the mechanism of store-operated calcium entry (SOCE) is essential for calcium homeostasis. However, neutrophil SOCE is not well understood because of the lack of specific pharmacological tools. It is necessary to first identify and characterize new molecules using a model of Jurkat T cells in which SOCE was the best characterized.

2-APB is the most widely used molecule in SOCE characterization due to its dual activity with a potentiation at lower concentrations [1-10 μM] and an inhibition at higher concentrations [$> 20 \mu\text{M}$]. However, this molecule lacks specificity because it acts on other cellular targets such as inositol (1,4,5)-trisphosphate receptors (InsP₃Rs). The first step is to select from a library of 8 commercial 2-APB analogues (Methoxy-APB, Dimethoxy-APB, Cyclic-APB, Benzothienyl-APB, Thienyl-APB and MDEB) those that are more specific and also more efficient molecules than 2-APB. Two interesting molecules were identified, MDEB as the only SOCE potentiating product currently known and the Benzothienyl-APB, which is a strong inhibitor. Like 2-APB, all these analogues inhibit InsP₃Rs except MDEB, which seems to be more specific. The effect of MDEB on the calcium current, I_{CRAC} , was also studied using the patch-clamp technique. MDEB increases ~ 4 times the I_{CRAC} amplitude in comparison with control. Otherwise, MDEB slows down the fast Ca^{2+} -dependent inactivation of I_{CRAC} .

Functionally, MDEB at increasing concentrations inhibits IL-2 synthesis in stimulated Jurkat T cells despite its potentiating activity on SOCE. The inhibition is due to MDEB induced apoptosis in stimulated Jurkat T cells.

MDEB and Benzothienyl-APB were then used as tools to study SOCE in a neutrophil-like cell model, the differentiated PLB-985 cells. SOCE was induced either by treatment of cells with thapsigargin (Tg) or physiologically with the chemotactic peptides fMLF and WKYMVm, ligands of formyl peptide receptors FPR and FPRL1 respectively. In addition, Tg-induced SOCE was modulated by 2-APB, potentiated by MDEB and inhibited by Benzothienyl-APB.

The consequences of these analogues on neutrophil functions were also studied. Phagocytosis of yeasts by PLB-985 cells and intraphagosomal ROS production were inhibited by MDEB and Benzothienyl-APB. Furthermore, extracellular ROS were also inhibited by Benzothienyl-APB. However, because of the high interference of MDEB with our techniques, its activities could not be studied.

In conclusion, MDEB and Benzothienyl-APB are new analogues of 2-APB potentiating and inhibiting SOCE, which allow us in the future a better understanding of leukocyte SOCE and its cellular roles.

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS

RESUME

SUMMARY

LISTE DES ABREVIATIONS

INTRODUCTION

| | | |
|------|---|----|
| I. | POLYMPHONUCLEAIRES NEUTROPHILES (PMN)..... | 15 |
| A. | DEFINITION | 15 |
| B. | GRANULES ET VESICULES DE SECRETION | 15 |
| C. | ACTIVATION DES NEUTROPHILES ET LEURS RECRUTEMENT..... | 16 |
| D. | MECANISMES DE DEFENSE CONTRE LES PATHOGENES | 17 |
| 1. | PHAGOCYTOSE..... | 18 |
| A) | DEFINITION | 18 |
| B) | LES RECEPTEURS INDUISANT LA PHAGOCYTOSE | 19 |
| 2. | PRODUCTION DE FORMES REACTIVES DE L'OXYGENE..... | 20 |
| A) | NADPH OXYDASE..... | 20 |
| B) | FORMES REACTIVES DE L'OXYGENE..... | 22 |
| E. | LES RECEPTEURS AUX PEPTIDES FORMYLES (FPR)..... | 22 |
| F. | ROLE DU Ca ²⁺ DANS LES NEUTROPHILES | 24 |
| G. | INFLUX CALCIQUE DANS LES NEUTROPHILES | 24 |
| II. | SIGNALISATION CALCIQUE | 27 |
| III. | CONCEPT DU STORE-OPERATED CALCIUM ENTRY (SOCE)..... | 30 |
| A. | LE MODELE DE L'ENTREE CAPACITIVE..... | 30 |
| B. | LE COURANT CRAC (<i>I_{CRAC}</i>)..... | 31 |
| C. | LE CONCEPT DU FACTEUR D'INFLUX DU Ca ²⁺ (CIF)..... | 34 |
| D. | LES CANAUX TRP COMME CANDIDATS DU SOCE..... | 34 |

| | | |
|-----|---|----|
| E. | ORAI ET STIM ET LE NOUVEAU CONCEPT DU SOCE | 35 |
| 1. | ORAI | 37 |
| 2. | STIM..... | 39 |
| 3. | INTERACTION STIM-ORAI ET L'ACTIVATION DU CANAL ORAI..... | 41 |
| F. | PHARMACOLOGIE DU SOCE | 42 |
| 1. | LES CATIONS TRIVALENTS | 42 |
| 2. | ML-9 | 43 |
| 3. | DERIVES DE PYRAZOLE..... | 44 |
| 4. | DERIVES IMIDAZOLES..... | 44 |
| 5. | LE 2-AMINOETHOXYDIPHENYL BORATE | 45 |
| A) | STRUCTURE ET ACTIVITE | 45 |
| B) | INTERET DU 2-APB | 47 |
| IV. | OBJECTIFS DE LA THESE | 49 |
| A. | CARACTERISATION DE NOUVEAUX OUTILS PHARMACOLOGIQUES | 50 |
| B. | CARACTERISATION DE L'INFLUX SOCE DES PLB-985..... | 51 |
| C. | ANALOGUES DE 2-APB ET FONCTIONS DES PLB-985 | 51 |

MATERIEL ET METHODES

| | | |
|------|---|----|
| V. | CULTURE CELLULAIRE | 53 |
| A. | LIGNEE JURKAT | 53 |
| B. | LIGNEE PLB-985 | 53 |
| 1. | CROISSANCE DES PLB-985..... | 54 |
| 2. | DIFFERENCIATION DES PLB-985..... | 54 |
| VI. | MESURE DES CONCENTRATIONS DU CALCIUM CYTOSOLIQUE..... | 54 |
| A. | MESURE DE L'INFLUX DU CALCIUM..... | 56 |
| B. | ANALOGUES DU 2-APB ET INFLUX DE CALCIUM | 57 |
| 1. | PRODUITS CHIMIQUES | 57 |
| 2. | ANALOGUES DU 2-APB | 57 |
| C. | LIBERATION DU CALCIUM A PARTIR DU RE | 60 |
| VII. | MESURE DE L'INFLUX DU BARYUM..... | 61 |

| | |
|--|----|
| VIII. MESURE DE L'INFLUX DU MANGANESE | 62 |
| IX. SYNTHÈSE D'INTERLEUKINE-2 (IL-2)..... | 62 |
| X. TEST TUNNEL..... | 63 |
| XI. MESURE SIMULTANÉE DE LA PHAGOCYTOSE ET LA PRODUCTION DES FRO A L'INTERIEUR DU PHAGOSOME | 63 |
| A. PRÉPARATION DU DICHLOROFLUORESCEINE (DCFH ₂)..... | 63 |
| B. MARQUAGE DES PARTICULES DE LEVURES | 64 |
| 1. PREMIÈRE ÉTAPE : AJOUT DE LA SONDE ALEXA 405 | 64 |
| 2. DEUXIÈME ÉTAPE : AJOUT DE LA SONDE DCFH ₂ | 65 |
| C. OPSONISATION DES LEVURES..... | 65 |
| D. Préparation des cellules PLB-985 différenciées..... | 66 |
| E. PRÉPARATION DES LEVURES | 66 |
| F. CYTOMETRIE EN FLUX | 66 |
| 1. Intensité et pourcentage de phagocytose | 69 |
| 2. INTENSITÉ ET POURCENTAGE DE FRO PRODUITES | 71 |
| XII. MESURE DE LA PRODUCTION DE FRO INTRA ET EXTRACELLULAIRES | 71 |
| A. CHIMILUMINESCENCE DU LUMINOL | 71 |
| B. FLUORESCENCE DE L'AMPLEX-ULTRA RED | 72 |
| XIII. PATCH CLAMP | 73 |
| XIV. ÉTUDES STATISTIQUES..... | 74 |

RESULTATS

| | |
|---|----|
| XV. EFFETS DES ANALOGUES DU 2-APB SUR L'INFLUX CALCIQUE DE TYPE SOCE..... | 76 |
| A. LA DOUBLE ACTIVITÉ DU 2-APB SUR L'INFLUX SOCE DES JURKAT | 76 |
| B. LE METHOXY-APB ET LE DIMETHOXY-APB POTENTIALISENT MOINS L'INFLUX SOCE 78 | |
| C. LE CYCLIC-APB NE POTENTIALISE PAS L'INFLUX SOCE..... | 80 |
| D. LE BENZOTHIENYL-APB EST UN PUISSANT INHIBITEUR DU SOCE DES CELLULES JURKAT..... | 81 |
| E. LE THIENYL-APB AGIT COMME LE 2-APB MAIS AVEC UNE MOINDRE AFFINITÉ | 83 |

| | | |
|--------|---|-----|
| F. | LE MDEB UN POTENTIALISANT PUISSANT DU SOCE..... | 84 |
| XVI. | EFFETS DES ANALOGUES DU 2-APB SUR LA LIBERATION DU CALCIUM A PARTIR DU RE PAR LES Ins ₃ PR | 86 |
| A. | LE METHOXY-APB ET LE DIMETHOXY-APB INHIBENT LA LIBERATION DU CALCIUM A PARTIR DU RE | 86 |
| B. | LE CYCLIC-APB ET LE BENZOTHIENYL-APB INHIBENT LA LIBERATION DU CALCIUM A PARTIR DU RE | 87 |
| C. | LE THIENYL-APB INHIBE LA LIBERATION DU Ca ²⁺ A PARTIR DU RE..... | 88 |
| D. | LE MDEB N' AFFECTE PAS LA LIBERATION DU CALCIUM A PARTIR DU RE..... | 89 |
| XVII. | LE MDEB AUGMENTE L' AMPLITUDE DU ICRAC DES CELLULES JURKAT | 90 |
| XVIII. | EFFETS DES ANALOGUES DU 2-APB SUR LA SYNTHESE DE L' INTERLEUKINE-2... 93 | |
| A. | LE CYCLIC-APB ET LE BENZOTHIENYL-APB INHIBENT LA SYNTHESE DE L' IL-2 DANS LES CELLULES JURKAT | 93 |
| B. | LE MDEB INHIBE LA SYNTHESE DE L' IL-2 DANS LES CELLULES JURKAT..... | 94 |
| XIX. | MDEB INDUIT UNE APOPTOSE DES CELLULES STIMULEES PAR LA PHYTOHEMAGGLUTININE..... | 95 |
| XX. | EFFETS DU 2-APB SUR L' INFLUX CALCIQUE DE TYPE SOCE | 97 |
| A. | SOCE INDUIT PAR LA THAPSIGARGINE | 97 |
| B. | SOCE INDUIT PAR LE PEPTIDE BACTERIEN fMLF | 98 |
| C. | SOCE INDUIT PAR LE PEPTIDE WKYMVM | 99 |
| D. | COMPARAISON ENTRE L' INFLUX SOCE SOUS DIFFERENTS STIMULI..... | 100 |
| XXI. | INFLUX DU Ba ²⁺ | 101 |
| XXII. | INFLUX DU MANGANESE | 102 |
| XXIII. | EFFET DU BENZOTHIENYL-APB ET LE MDEB SUR L' INFLUX SOCE | 104 |
| A. | SOCE INDUIT PAR THAPSIGARGINE | 104 |
| B. | SOCE INDUIT PAR fMLF | 105 |
| XXIV. | EFFET DU BENZOTHIENYL-APB ET LE MDEB SUR L' INFLUX Mn ²⁺ | 106 |
| A. | STIMULATION fMLF | 106 |
| B. | STIMULATION WKYMVM | 107 |
| C. | STIMULATION THAPSIGARGINE..... | 109 |
| XXV. | MESURE DE LA PHAGOCYTOSE ET LA PRODUCTION DE FRO INTRAPHAGOSOMALES | 110 |

| | | |
|---------|---|-----|
| A. | PHAGOCYTOSE DES LEVURES PAR LES CELLULES PLB-985 | 110 |
| B. | Production de FRO intraphagosomales | 112 |
| XXVI. | MESURE DE LA PRODUCTION DE FRO EXTRACELLULAIRES | 113 |
| A. | CHIMILUMINESCENCE DU LUMINOL..... | 113 |
| 1. | STIMULATION AU fMLF | 113 |
| A) | Le Benzothienyl-APB inhibe complètement la production de FRO | 113 |
| B) | INHIBITION PARTIELLE DE LA PRODUCTION DE FRO PAR LE SKF-96365 | 115 |
| C) | Le 2-APB inhibe complètement la production de FRO | 116 |
| D) | INTERFERENCE DU MDEB AVEC LA MESURE AU LUMINOL | 119 |
| 2. | STIMULATION AU PHORBOL MYRISTATE ACETATE (PMA)..... | 120 |
| A) | Le benzothienyl-APB neutralise les FRO..... | 120 |
| B) | EFFET DU 2-APB | 121 |
| C) | Effet du MDEB..... | 122 |
| XXVII. | MESURE SIMULTANEE DU CALCIUM ET DE LA PRODUCTION DE FRO | 123 |
| XXVIII. | DESENSIBILISATION DES RECEPTEURS FPR | 126 |
| XXIX. | <i>I</i> _{SO} DES PLB-985 DIFFERENCIEES | 127 |

DISCUSSION

| | | |
|---------|---|-----|
| XXX. | EFFETS DES ANALOGUES DU 2-APB SUR LE SOCE..... | 133 |
| A. | LE CYCLIC-APB INHIBE LE SOCE AVEC UNE IC ₅₀ DE 3 µM..... | 133 |
| B. | LE BENZOTHIENYL-APB EST UN PUISSANT INHIBITEUR DU SOCE AVEC UNE IC ₅₀ DE 0,4 µM..... | 134 |
| C. | DOUBLE ACTIVITE DU THIENYL-APB SUR LE SOCE..... | 134 |
| D. | METHOXY-APB ET DIMETHOXY-APB POTENTIALISENT MOINS LE SOCE..... | 135 |
| E. | MDEB UN POTENTIALISANT DU SOCE | 136 |
| XXXI. | EFFETS DES ANALOGUES DU 2-APB SUR LES INSP ₃ RS..... | 136 |
| XXXII. | MDEB POTENTIALISE LE <i>I</i> _{CRAC} | 136 |
| XXXIII. | ANALOGUES DU 2-APB ET SYNTHESE DE L'IL-2 | 137 |
| XXXIV. | INFLUX SOCE DES PLB-985..... | 138 |
| A. | EFFETS DES ANALOGUES DU 2-APB SUR LE SOCE DES PLB-985 | 139 |

| | |
|---|-----|
| B. EFFETS DU Ca ²⁺ SUR LA PHAGOCYTOSE DES LEVURES..... | 140 |
| C. EFFETS DES ANALOGUES DU 2-APB SUR LA PHAGOCYTOSE DES LEVURES | 142 |
| D. EFFETS DU Ca ²⁺ SUR LA PRODUCTION DE FRO INTRAPHAGOSOMALES | 143 |
| E. EFFETS DU BENZOTHIENYL-APB ET MDEB SUR LA PRODUCTION DE FRO EXTRA ET INTRACELLULAIRES | 144 |

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

| | |
|--|-----|
| XXXV. CONCLUSION ET PERSPECTIVES | 148 |
|--|-----|

ANNEXE

| | |
|--|-----|
| XXXVI. ANNEXE..... | 152 |
| A. Manuscrit n°1 | 154 |
| B. Manuscrit n°2..... | 184 |
| XXXVII. COMMUNICATIONS ORALES ET POSTERS | 212 |
| XXXVIII. MISSION HORS-RECHERCHE ENSEIGNEMENT BIOCHIMIE | 213 |
| XXXIX. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES..... | 214 |
| XL. ANNEXE TABLEAUX ET FIGURES..... | 233 |

LISTE DES ABREVIATIONS

| | |
|--|--|
| [Ba²⁺]_{cyt} | Concentration du Baryum cytosolique |
| [Ca²⁺]_{cyt} | Concentration du Ca ²⁺ cytosolique |
| 2-APB | 2-aminoéthoxydiphényl borate |
| AA | Acide arachidonique |
| ASB | Albumine du sérum bovin |
| BAPTA | acide 1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacétique |
| BOC | Bore-oxygène-carbone |
| BTP2 | 3,5-bistrifluorométhyl pyrazol |
| CAD | CRAC activating domain |
| CD | Cluster of Differentiation |
| CGD | Chronic Granulomatous Disease |
| CIF | Calcium Influx Factor |
| CR | Complement Receptor |
| CRACM | Calcium release activated calcium molecule |
| DAG | diacylglycérol |
| DCFH₂ | 2', 7'-dichlorodihydrofluoresceine |
| DMSO | Diméthyl Sulfoxyde |
| DTM | domaine transmembranaire |
| EGTA | acide éthylène glycol-bis(2-aminoéthylether)-N,N,N',N'-tetraacétique |
| fMLF | N-formyl-Méthionyl-Leucyl-Phénylalanine |
| FPR | Formyl Peptide Receptor |
| FPRL1 | Formyl Peptide Receptor Like 1 |
| FRET | Fluorescence resonance energy transfer |
| FRO | Forme Réactive de l'Oxygène |
| FSC | Forward Scatter |
| G-CSF | Granulocyte colony stimulating factor |

| | |
|--------------------------|--|
| HBS | Hepes Buffer Saline |
| HRP | Horseradish Peroxidase |
| IC₅₀ | Concentration qui inhibe 50% de l'effet maximal |
| ICAM | InterCellular Adhesion Molecule |
| I_{CRAC} | Calcium release activated calcium current |
| IL | Interleukine |
| InsP₃ | inositol-(1,4,5)trisphosphate |
| InsP₃R | inositol-(1,4,5)trisphosphate receptor |
| iPLA₂β | phospholipase A2 beta Ca ²⁺ -indépendante |
| K_D | Constante de dissociation |
| LGC | Ligand Gated Channel |
| LPS | Lipopolysaccharide |
| MLCK | Myosin Light Chain Kinase |
| MPO | Myéloperoxydase |
| NAADP | Nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate |
| NADPH | Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate |
| NCX | Echangeur Na ⁺ /Ca ²⁺ |
| NET | Neutrophil extracellular trap |
| NFAT | Nuclear of activated T cell |
| NK | Natural killer |
| NS | Non significatif |
| OASF | Orai1 activating small fragment |
| PBS | Phosphate Buffer Saline |
| PHA | Phytohémagglutinine |
| PHOX | Phagocyte Oxidase |
| PI₃K | phosphoinositide 3-kinase |
| PLC | Phospholipase C |
| PMCA | Plasma Membrane Ca ²⁺ ATPase |

| | |
|-----------------------------------|---|
| PMN | Polymorphonucléaire neutrophile |
| PtdIns(3,4,5)P₃ | phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate |
| PtdIns(4,5)P₂ | phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate |
| RE | Réticulum endoplasmique |
| RS | Réticulum Sarcoplasmique |
| RyR | Ryanodine Receptor |
| SAM | Sterile α -motif |
| SCID | Severe Combined Immunodeficiency Disease |
| SERCA | Sarco-Endoplasmic Reticulum Ca ²⁺ ATPase |
| SMOC | second messenger-operated channel |
| SOAR | STIM1-Orai1 activating region |
| SOC | Store Operated Calcium Channel |
| SOCE | Store-operated calcium entry |
| SSC | Side Scatter |
| STIM | Stromal Interaction Molecule |
| SVF | Sérum de Veau Foetal |
| TCR | T Cell Receptor |
| TG | Thapsigargine |
| TNF | Tumor necrosis factor |
| TPC | Two-Pore Channel |
| TRP | Transient Receptor Potential) |
| WKYMVm | Trp-Lys-Tyr-Met-Val-D-Met-NH ₂ |

INTRODUCTION

INTRODUCTION

I. POLYMORPHONUCLEAIRES NEUTROPHILES (PMN)

A. DEFINITION

Les Polymorphonucléaires neutrophiles (PMNs) sont des cellules de l'immunité innée dont le rôle est de protéger l'organisme contre les pathogènes. Des déficits dans l'activité microbicide des PMNs ou leur sur-activation sont délétères pour l'organisme. Les PMN sont les premiers leucocytes recrutés au site de l'inflammation. Les neutrophiles sont générés régulièrement dans la moelle osseuse à partir de précurseurs myéloïdes par un processus appelé granulopoïèse. Tout au long de leur formation, les PMN sont sous le contrôle de facteurs de croissance comme le G-CSF (*Granulocyte-Colony stimulating factor*). Lorsque les neutrophiles atteignent le stade mature, ils passent dans la circulation sanguine, ils représentent entre 50 et 70% des leucocytes circulant dans le sang. Les neutrophiles matures possèdent un noyau polylobé et ont un diamètre moyen entre 7-10 μM , leur cytoplasme est riche en vésicules sécrétoires et granules.

Lors de l'inflammation, les PMN quittent la circulation sanguine pour aller s'accumuler au niveau des tissus lésés afin de neutraliser les pathogènes. Ils meurent ensuite par apoptose et ils sont pris en charge par les macrophages et les cellules dendritiques. (Kolaczowska et Kubes, 2013).

B. GRANULES ET VESICULES DE SECRETION

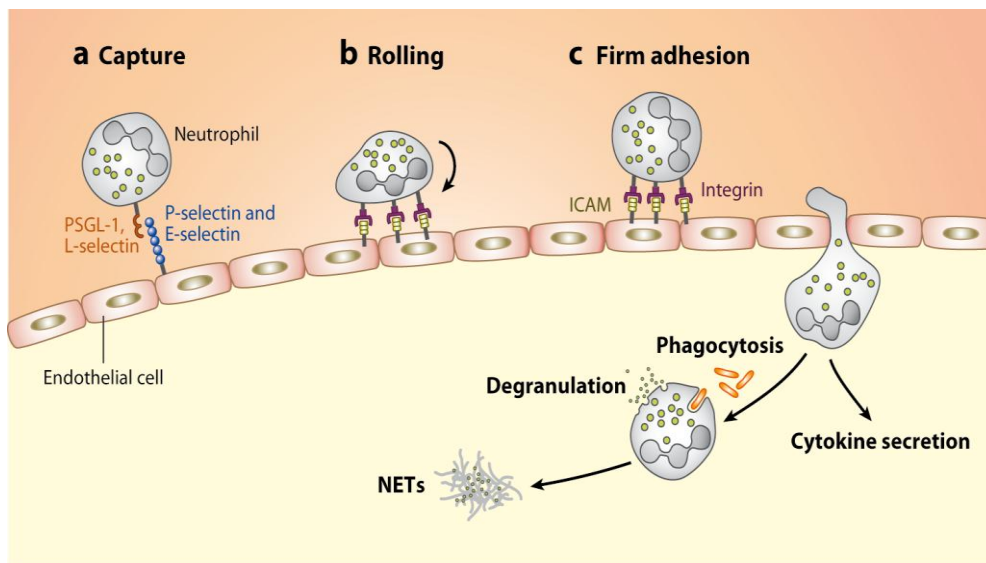
Les granules formées par les neutrophiles peuvent être subdivisées en trois types, des granules primaires azurophiles qui contiennent la myéloperoxydase (MPO), des

granules secondaires spécifiques contenant de la lactoferrine et enfin des granules tertiaires ou gélatinase qui contiennent les métallo-protéases du matrice de type 9.

En plus des granules, les neutrophiles contiennent dans leurs cytoplasmes des vésicules de sécrétion qui lors de l'activation du neutrophile transportent à la membrane cellulaire des molécules nécessaires à l'adhésion cellulaire comme la β -intégrine.

C. ACTIVATION DES NEUTROPHILES ET LEURS RECRUTEMENT

Au site de l'inflammation, les produits provenant du pathogène et des cellules hôtes sont nombreux. Leur rôle est de stimuler les cellules endothéliales présentes sur le site de l'inflammation. Ces stimulants comprennent le Lipopolysaccharide (LPS), le peptide bactérien fMLF, des cytokines comme le $\text{TNF}\alpha$, interleukine 1β (IL- 1β) et IL-17. Les cellules endothéliales produisent ainsi des molécules d'adhésion comme les P-sélectines, E-sélectines et ICAMs. Les neutrophiles reconnaissent les sélectines à la membrane des cellules endothéliales et démarrent ainsi un processus appelé « *Rolling* » ou roulement à la surface de l'endothélium sanguin. Ensuite, les neutrophiles adhèrent fermement aux cellules endothéliales grâce à d'autres molécules appelées les β -intégrines en se fixant sur leurs ligands endothéliaux les molécules ICAM. Les neutrophiles arrivent à passer la paroi endothéliale et se trouvent dans le site de l'inflammation où ils seront guidés à la fois par les chimio-attractant bactériens (fMLF) et par des cytokines (IL-8) produits par l'hôte. Finalement, par des voies de signalisation complexes les neutrophiles commencent leurs activités microbicides dans le but d'éliminer le pathogène. Ces activités comprennent la phagocytose, la production de formes réactives de l'oxygène (FRO), la dégranulation et la production de NET (**figure 1**) (Amulic *et al.*, 2012).



AR Amulic B, et al. 2012.
Annu. Rev. Immunol. 30:459–89

Figure 1. Le recrutement du neutrophile au site de l'inflammation. a) Les cellules endothéliales exposent les sélectines à leurs surfaces qui captent le neutrophile et le fixe à l'endothélium. b) Le *rolling* du neutrophile c) Adhésion par les intégrines. Le neutrophile traverse la paroi endothéliale et arrive au site de l'inflammation pour enfin éliminer le pathogène par phagocytose, dégranulation et formation des NETs (**Amulic et al., 2012**).

D. MECANISMES DE DEFENSE CONTRE LES PATHOGENES

Les neutrophiles éliminent les micro-organismes pathogènes par plusieurs mécanismes comme la phagocytose, la production de FRO par la NADPH oxydase et également la dégranulation. Seules la phagocytose et la production de FRO seront détaillées dans ce chapitre.

Suite à l'activation des neutrophiles, les granules sont mobilisées pour aller fusionner avec la membrane plasmique ou le phagosome pour ensuite libérer leurs contenus. Le contenu des granules libérées à l'intérieur du phagosome et dans le milieu

extérieur contient des protéines antibactériennes comme les cathepsines, les défensines, la lactoferrine et des lysozymes.

Les neutrophiles activés peuvent aussi éliminer les micro-organismes extracellulaires par libération de facteurs appelés NET (*Neutrophil extracellular trap*) composés d'ADN associé à des histones, des lactoferrines, des cathepsines, des MPO. Leur fonction est d'immobiliser les pathogènes en facilitant leur ingestion par les neutrophiles.

1. PHAGOCYTOSE

a) DEFINITION

La phagocytose est un mécanisme de la défense innée contre les pathogènes. Le contact entre le phagocyte et le pathogène est initié par la liaison de ligands situés à la surface des pathogènes avec leurs récepteurs sur la membrane plasmique. Ces ligands peuvent être des opsonines générées par l'hôte, comme des anticorps et des protéines du complément, ou bien des composants bactériens comme le LPS composant essentiel des membranes des bactéries à Gram négatif. Cette interaction cellule-pathogène est accompagnée par des processus intracellulaires complexes comme le trafic membranaire, le réarrangement du cytosquelette, la production et la libération des produits pro-inflammatoires comme les cytokines et les chimiokines (**Underhill et Ozinsky, 2002**). La complexité de la phagocytose est en partie due à la diversité des récepteurs impliqués, par exemple un pathogène est capable d'être reconnu par plusieurs types de récepteurs et ces mêmes récepteurs possèdent également des doubles fonctions comme l'adhésion et la phagocytose, deux processus extrêmement complexes (**Aderem et Underhill, 1999**).

b) LES RECEPTEURS INDUISANT LA PHAGOCYTOSE

i. Les récepteurs Fc γ

L'opsonisation des particules par des anticorps IgG permet de favoriser leur phagocytose par liaison des récepteurs à la surface du phagocyte avec les régions Fc des IgG. Trois classes de récepteurs pour l'IgG sont connues aujourd'hui, Fc γ RI, Fc γ RII et Fc γ RIII. Chacune des classes est divisée en isoformes: Fc γ RI ou CD64 est codé par trois gènes A, B et C; et il est exprimé dans les monocytes, macrophages et les neutrophiles stimulés par l'interféron γ . C'est un récepteur à forte affinité capable de lier les IgGs monomériques. Le Fc γ RII ou CD32 est codé par trois gènes A, B et C. En revanche c'est un récepteur de faible affinité ne liant que les formes multimériques d'IgG. Fc γ RIII ou CD16 est codé par deux gènes A et B avec une faible affinité pour les IgGs. Le Fc γ RIIIA est exprimé dans les macrophages et les monocytes tandis que le Fc γ RIIIB est spécifique aux neutrophiles. La plupart des isoformes Fc γ RI, Fc γ RIIA et Fc γ RIIIA sont capable d'induire la phagocytose. En revanche, l'isoforme Fc γ RIIB régule négativement la phagocytose. La phagocytose médié par l'IgG par les neutrophiles humains est Ca²⁺-dépendante. Dans les neutrophiles humains, on retrouve les deux classes de Fc γ R : Fc γ RII (isoformes A et C) et Fc γ RIIIB.

ii. Les récepteurs au complément

Les particules opsonisées par les protéines du complément sont reconnues et internalisées par des récepteurs spécifiques aux compléments. Dans les neutrophiles, quatre types de récepteurs aux compléments (*Complement receptor*, CR) sont présents CR1, CR2, CR3 et CR4. Les CR4 ne sont pas très bien caractérisés et les CR2 n'ont pas été décrits comme des récepteurs induisant la phagocytose. CR1 est une molécule transmembranaire constituée d'une seule chaîne. Elle se lie aux opsonines microbiens comme les particules du complément C1q, C4b et C3b. CR1 n'induit pas par lui

même l'internalisation de particules sans signaux additionnels. CR3 et CR4 sont hétérodimériques elles reconnaissent C3b (**Underhill et Ozinsky, 2002**).

Les cytokines pro-inflammatoires (TNF α) et le LPS stimulent la phagocytose du pathogène *via* le CR3. *In vitro*, la phagocytose induite par le CR3 est activée par les esters de phorbol ce qui suggère que cette voie implique la PKC (**Underhill et Ozinsky, 2002**).

2. PRODUCTION DE FORMES REACTIVES DE L'OXYGENE

La production de FRO par les neutrophiles est une des activités microbicides les plus importantes. Elle est assurée par un complexe enzymatique appelé NADPH Oxydase.

Une mutation au niveau de cette enzyme la rendant non fonctionnelle est responsable d'une granulomatose septique chronique (*Chronic granulomatous disease, CGD*). Les patients souffrant de cette maladie sont susceptibles de développer plusieurs infections sévères et récurrentes.

a) NADPH OXYDASE

Le complexe de la NADPH oxydase est un complexe enzymatique de transfert d'électrons. Il est constitué à la fois de protéines cytosoliques et autres protéines liées à la membrane plasmique. Ce complexe est non rassemblé à l'état de repos. Les composants membranaires sont constitués d'une protéine hétérodimérique flavocytochrome b_{558} (Cytochrome *b*) composée de deux sous-unités : gp91^{phox} (*phox* pour *phagocyte oxidase*) et p22^{phox}. Ce cytochrome *b* constitue la partie catalytique de la chaîne de transfert d'électrons de la NADPH oxydase. A l'état de repos, les composants cytosoliques comportant les sous-unités p67^{phox}, p47^{phox}, p40^{phox} et la petite protéine G Rac (avec deux isoformes Rac1 et Rac2) ne sont pas associés au cytochrome *b*.

Lors de l'activation des neutrophiles, la sous-unité $p47^{phox}$ est phosphorylée, elle migre ensuite vers la membrane plasmique en entraînant avec elle les autres sous-unités cytosoliques $p67^{phox}$, $p40^{phox}$ qui sont légèrement phosphorylées. Les sous-unités $p67^{phox}$, $p47^{phox}$, $p40^{phox}$ s'associent au cytochrome b afin de former une NADPH oxydase active prête à fonctionner (**figure 2**)(Bylund *et al.*, 2010).

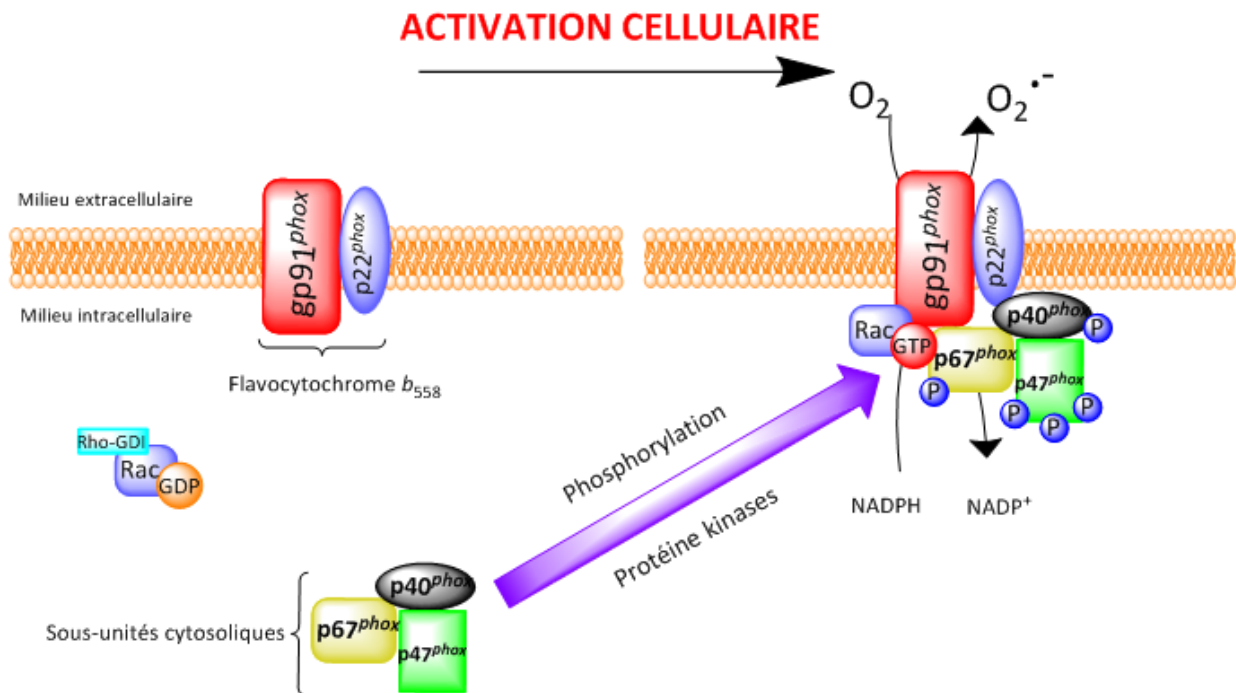


Figure 2. Activation et assemblage de la NADPH oxydase. Lors de l'activation de la NADPH oxydase, les sous-unités $p40^{phox}$, $p47^{phox}$ et $p67^{phox}$ s'associent au flavocytochrome b_{558} composé de la $gp91^{phox}$ et de la $p22^{phox}$. Cette activation nécessite des protéines kinases, des enzymes du métabolisme lipidique et des facteurs d'échange nucléotidique (**Lambeth, 2004**).

b) FORMES REACTIVES DE L'OXYGENE

La NADPH oxydase une fois activée elle transfère les électrons à partir de son substrat dans le cytoplasme, le NADPH vers un accepteur final d'électrons, l'O₂ moléculaire qui par une réduction mono-électrique produit un anion superoxyde (O₂⁻). Ce dernier se dismute de manière spontanée en peroxyde d'hydrogène H₂O₂. Ces FRO primaires (O₂⁻ et H₂O₂) peuvent encore générer des métabolites réactifs comme le radical hydroxyle (OH[°]) par interaction de H₂O₂ avec le O₂⁻ en présence des ions Fe³⁺. Un autre métabolite très réactif l'acide hypochloreux (HOCl) est généré par la réaction de H₂O₂ avec les ions Cl⁻ (Spletstoeser et Schuff-Werner, 2002). La formation de HOCl est catalysée par la MPO (Klebanoff *et al.*, 2013) contenue dans les granules azurophiles des neutrophiles (Faurichou et Borregaard, 2003). Le cytochrome *b* est présent à la fois à la membrane plasmique et sur les membranes des granules (Borregaard *et al.*, 1983), suggérant que les membranes des granules peuvent être des sites pour l'assemblage et l'activation de la NADPH oxydase (Kobayashi *et al.*, 1998). L'activation de la NADPH oxydase à la membrane plasmique induit la libération de FRO dans le milieu extracellulaire. L'assemblage peut se produire dans la membrane interne du phagosome et qui conduit à une production de FRO intraphagosomales ou à l'intérieur des granules sans formation de phagosome (Bylund *et al.*, 2010).

E. LES RECEPTEURS AUX PEPTIDES FORMYLES (FPR)

Les récepteurs aux peptides formylés (*Formyl peptide receptor*, FPR) sont considérés comme des éléments essentiels dans la défense de l'hôte contre les pathogènes. La stimulation des FPR par le fMLF induit plusieurs activités comme le chimiotactisme, l'adhésion, la phagocytose et la libération de FRO et le contenu des granules (Le *et al.*, 2001). L'importance des FPR dans la défense immunitaire a été mise en évidence *in vivo* dans des souris FPR^{-/-}. Ces souris sont moins résistantes à une infection par

Listeria monocytogenes et développent une charge bactérienne plus importante au niveau de la rate et le foie par rapport aux souris normales. En plus, dans ces souris le chimiotactisme des neutrophiles *in vitro* et leur mobilisation à partir du sang périphérique *in vivo* en réponse au fMLF étaient absents (Gao *et al.*, 1999).

Chez l'homme, il existe trois gènes qui codent pour trois types de récepteurs aux peptides formylés, les FPR, les FPRL1 (*FPR-like 1*) et FPRL2. FPR et FPRL1 sont des récepteurs à sept domaines transmembranaires (DTM) couplés aux protéines G. Ils partagent 69% d'homologie sur les séquences d'acides aminés (Le *et al.*, 2002). Il a été montré que le fMLF se fixe à son récepteur FPR avec une haute affinité $K_D = 1$ nM en comparaison avec le FPRL1 ($K_D = 430$ nM) (Ye *et al.*, 1992, Quehenberger *et al.*, 1993). Du point de vue fonctionnel, les FPR sont des récepteurs couplés à la protéine $G_{i\alpha 1}$, $G_{i\alpha 2}$ et $G_{i\alpha 3}$. Lors de la stimulation de ces récepteurs, la sous-unité $G_{i\alpha}$ active la Phospholipase C (PLC) et la phosphoinositide 3-kinase (PI₃K). Cette dernière transforme le phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate membranaire (PtdIns(4,5)P₂) en phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate (PtdIns(3,4,5)P₃). Cette cascade de réactions génère de l'inositol-(1,4,5)trisphosphate (InsP₃) qui induit la mobilisation du Ca²⁺ à partir des réserves intracellulaires. Lors de l'activation des FPR et suite à des réactions de phosphorylation, ces récepteurs ne sont plus capables de répondre aux stimulations par leurs ligands et ils sont par conséquent désensibilisés (Prossnitz, 1997) (Le *et al.*, 2002).

Il a été montré que l'hexapeptide Trp-Lys-Tyr-Met-Val-D-Met-NH₂ (WKYMVm) est un puissant activateur de plusieurs fonctions leucocytaires comme le chimiotactisme, la mobilisation du récepteur au complément CR3 et l'activation de la NADPH oxydase (Seo *et al.*, 1997). Dans les neutrophiles, il a été montré que le WKYMVm se lie aux deux récepteurs FPR et FPRL1 (Christophe *et al.*, 2001). Le WKYMVm possède une capacité pour activer le FPR comparable au fMLF. En revanche, il est de loin plus puissant que le fMLF pour activer le FPRL1 (Le *et al.*, 1999).

Le fMLF est un des plus puissants produits chimio-attractants impliqués dans la migration cellulaire, la phagocytose et la libération des facteurs pro-inflammatoires (Prossnitz et Ye, 1997). L'activation des FPR et FPRL1 conduit à la production de FRO, la dégranulation et la phagocytose de pathogènes (Nunes et Demaurex, 2010).

F. ROLE DU Ca^{2+} DANS LES NEUTROPHILES

Les PMNs représente l'acteur principal dans la défense immunitaire innée de l'organisme contre les pathogènes. Le Ca^{2+} est un second messenger qui joue un rôle primordial pour assurer les fonctions des neutrophiles à court terme comme la production de FRO (Demaurex *et al.*, 1994), le chimiotactisme (Salmon et Ahluwalia, 2010b), la phagocytose (Bei *et al.*, 1998), le changement de pH intracellulaire et la libération des granules, et à long terme comme l'expression des cytokines et la formation des NETs (Burgos *et al.*, 2011). L'augmentation de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ survient suite à la mobilisation du Ca^{2+} à partir du réticulum endoplasmique (RE) suivie d'un influx de Ca^{2+} (Montero *et al.*, 1991) qui est nécessaire pour assurer des fonctions cellulaires vitales comme la différenciation, la prolifération, l'expression génétique, la mobilité cellulaire, la sécrétion des vésicules contenant des cytokines, ou les facteurs pro-inflammatoires (Underhill et Ozinsky, 2002).

G. INFLUX CALCIQUE DANS LES NEUTROPHILES

Dans les cellules non excitables comme les neutrophiles, l'influx calcique est secondaire à la libération du Ca^{2+} à partir du RE, un mécanisme appelé SOCE (*Store-operated calcium entry*). Cette voie d'entrée du Ca^{2+} sera détaillée plus loin.

Le SOCE joue un rôle important dans l'immunité innée portée par les mastocytes, les cellules NK (*Natural killer*), les neutrophiles, les macrophages et les cellules dendritiques. D'ailleurs, les mastocytes avec les lymphocytes T sont les premiers témoins de la découverte du *I_{CRAC}* le courant généré par le SOCE (Hoth et Penner,

1992). Suivant l'induction du SOCE, surviennent la dégranulation des mastocytes et la libération de l'histamine (**Hide et Beaven, 1991, Penner, 1988, Takei et al., 1989**). Dans les cellules NK, la stimulation du Fc γ RIIIa (ou CD16) induit le SOCE qui participe ainsi à l'activité cytolytique (**Ng et al., 1987, Cassatella et al., 1989**). Dans les cellules dendritiques, la stimulation des récepteurs aux chimiokines induit l'activation du canal CRAC (**Hsu et al., 2001**). Ceci a comme effets, la maturation des cellules dendritiques, l'expression des molécules de CMH de classe II et migration des cellules dendritiques vers les organes lymphoïdes secondaires (**Feske, 2007**).

Dans les neutrophiles, le SOCE joue un rôle important dans le contrôle de la production de FRO (**Hallett et al., 1990**), le chimiotactisme (**Tarlowe et al., 2003**) et la dégranulation (**Kankaanranta et al., 1995**).

Le SOCE se produit lors de l'activation de différents types de récepteurs, les Fc γ RIIa et Fc γ RIIIb (**Aderem et Underhill, 1999**), les récepteurs aux chimiokines (**Schorr et al., 1999**) et les FPR (**Geiszt et al., 1999**). Ces récepteurs sont couplés à la PLC (PLC β et PLC γ 2) qui génère l'InsP $_3$ après hydrolyse du PtdIns(4,5)P $_2$. L'InsP $_3$ diffuse rapidement dans le cytosol et se fixe sur son récepteur l'InsP $_3$ R à la membrane du RE (**figure 3**). L'InsP $_3$ R est un récepteur canal sélectif au Ca $^{2+}$ qui libère les ions Ca $^{2+}$ contenus dans le RE. Cette mobilisation du Ca $^{2+}$ est ensuite suivie par une entrée de calcium par le SOCE, un mécanisme qui sera décrit en détail plus loin (**Parekh et Putney, 2005**).

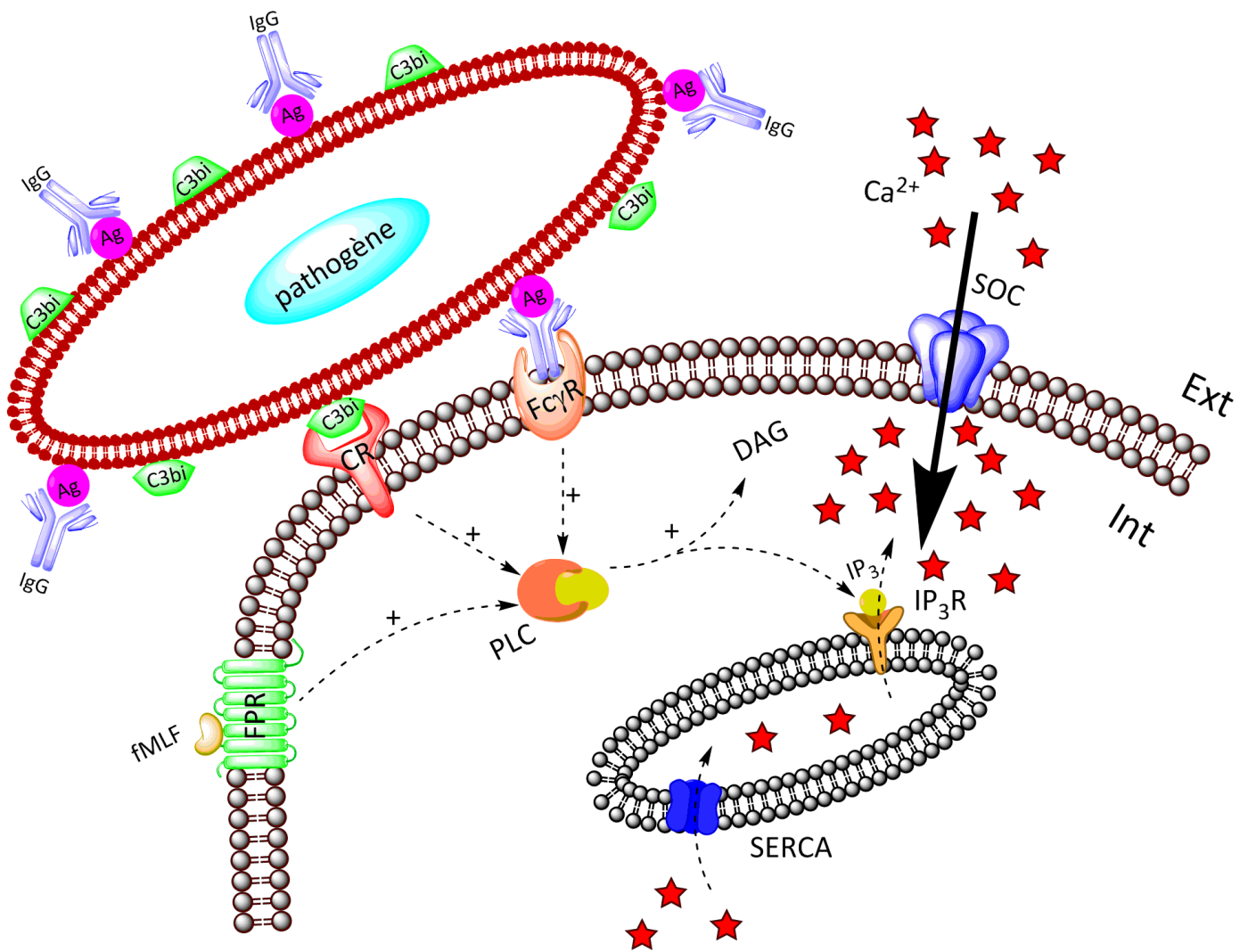


Figure 3. Activation des récepteurs et influx calcique dans les neutrophiles. L'activation des récepteurs FcγR, CR3 et FPR active des voies de signalisation qui impliquent la phosphorylation et l'activation de la PLC. La PLC activée génère de l'IP₃ qui diffuse librement dans le cytosol, se lie à son récepteur à la membrane du RE et induit une libération du Ca²⁺. La déplétion des réserves calciques dans le RE conduit à l'activation du SOCE et l'influx calcique. Ag, antigène ; FcγR, récepteur Fcγ ; CR, récepteur au complément ; FPR, récepteur au peptide formylé ; SOC, Store-operated Calcium Channel ; PLC, phospholipase C ; DAG, diacyl glycérol ; IP₃, inositol(1,4,5)trisphosphate ; IP₃R, récepteur à l'inositol(1,4,5)trisphosphate ; SERCA, sarco-endoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase

II. SIGNALISATION CALCIQUE

En absence de stimuli, la cellule maintient la $[Ca^{2+}]_{cyt}$ en ordre de nanomolaires (nM) surtout grâce à la présence à la fois à la membrane plasmique des pompes Ca^{2+} -ATPase, PMCA (*Plasma Membrane Ca^{2+} ATPase*) et également au niveau du RE des pompes SERCA (*Sarco-Endoplasmic Reticulum Ca^{2+} ATPase*).

Lorsqu'un ligand se fixe à son récepteur membranaire couplé à la PLC, cette dernière est activée et elle catalyse le clivage du PtdIns(4,5)P₂ en diacylglycérol (DAG) et en InsP₃. L'InsP₃, un second messenger qui diffuse rapidement dans le cytosol et interagit avec son récepteur InsP₃R présent à la membrane du RE. Lorsque les ions Ca^{2+} sont mobilisés de leurs réserves, des protéines STIM (*Stromal interaction molecule*) s'activent et migrent vers les jonctions entre le RE et la membrane plasmique où elles interagissent avec les protéines Orai1 localisées à la membrane plasmique. Cette interaction STIM-Orai induit l'ouverture du canal SOC, l'influx massif du calcium et par conséquent le remplissage des réserves calciques *de novo*. Dans les muscles squelettiques, STIM peut être activée suite à l'activation du récepteur canal à la ryanodine (RyR), qui permet la libération du Ca^{2+} à partir des réserves intracellulaires (**figure 4.A**).

Les propriétés et les fonctions des canaux calciques sont représentées en (**figure 4.B**). Les signaux calciques sont générés par divers canaux qui ont des temps d'activation très différents. Ceci engendre des réponses cellulaires Ca^{2+} -dépendantes distinctes et orchestrées par des canaux bien définis. Les canaux voltage-dépendant Ca_v sont activés par une dépolarisation membranaire à une échelle de temps très petite de l'ordre de μs . Dans les muscles squelettiques, les RyR1s couplés aux canaux $Ca_v1.1$ sont activés rapidement par une interaction protéine-protéine et libèrent du Ca^{2+} à partir du réticulum sarcoplasmique (RS). En revanche, dans le muscle cardiaque, l'activation du RyR2 est légèrement plus lente car elle dépend de l'entrée de Ca^{2+} à travers le $Ca_v1.2$ (**Schneider et Chandler, 1973, Rios et Brum, 1987**). Les canaux

ouverts par des ligands (LGC) sont activés par la fixation de ligands extracellulaires comme l'ATP et représentent des cinétiques d'activation distinctes dépendantes du ligand. L'activation de l'InsP₃Rs dépend de la production de son ligand l'InsP₃. Les SMOCs (*second messenger-operated channels*) sont des canaux de la membrane plasmique qui s'ouvrent en réponse à la fixation des seconds messagers intracellulaires comme le DAG, les nucléotides et l'acide arachidonique (AA) (**Berridge et al., 2003**). Les TPCs (*Two-pore channels*) constituent des récepteurs pour le NAADP (*Nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate*) qui permettent la libération du Ca²⁺ à partir des lysosomes (**Calcraft et al., 2009**). Le délai d'activation des SMOCs et des TPCs dépend de la production des ligands correspondant. Les canaux Orai s'activent lentement car leur activation dépend de la libération du Ca²⁺ à partir du RE et la migration de STIM et Orai au niveau des jonctions ER-membrane plasmique. Ces canaux peuvent rester actifs pour une longue durée selon l'état des réserves en Ca²⁺ du RE. Les réponses cellulaires montrent que le Ca_v et le RyR participe plutôt aux événements rapides comme l'exocytose et la contraction. Par ailleurs, les canaux formés par Orai participent à la régulation des événements à long terme comme la transcription génomique (**Soboloff et al., 2012**).

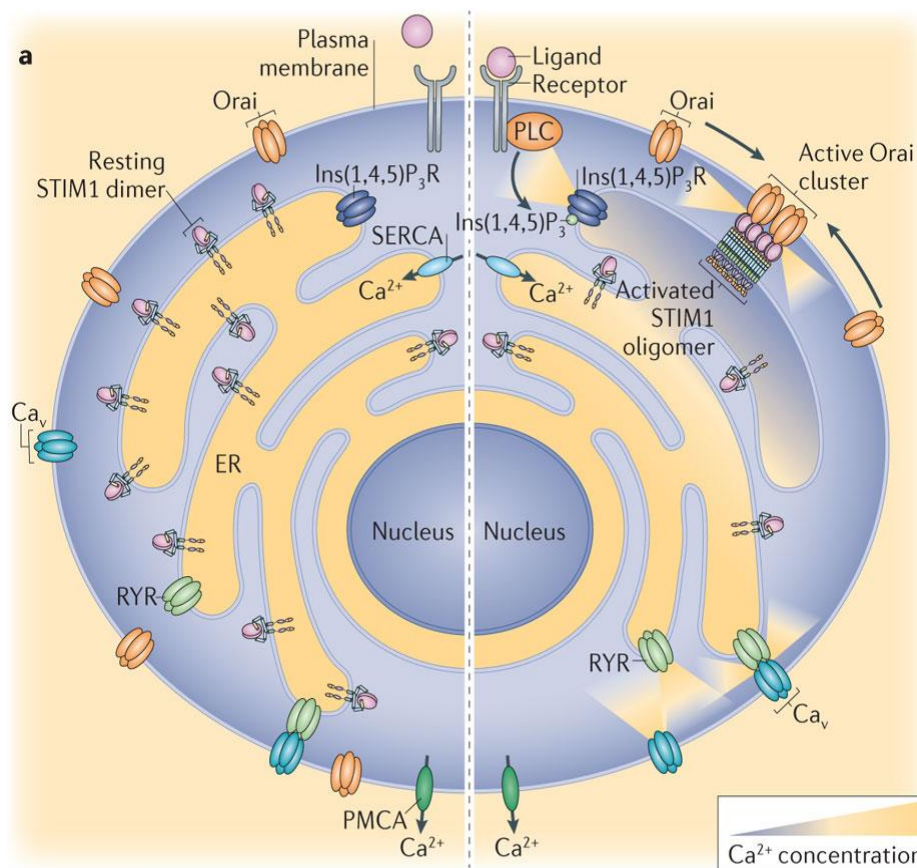
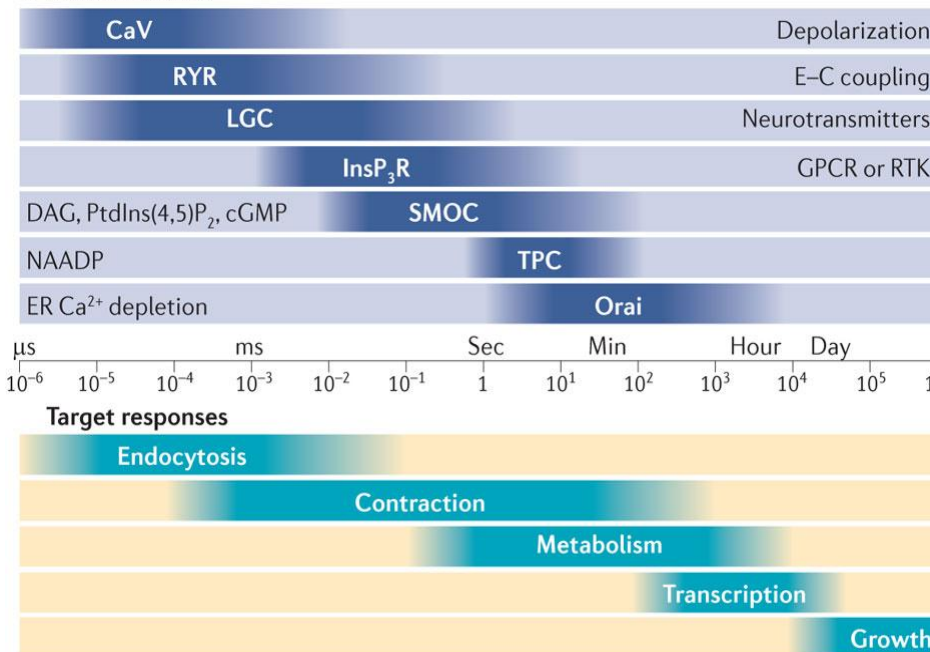


Figure 4. Signalisation calcique cellulaire. a) Au repos, les cellules maintiennent la $[Ca^{2+}]_{cyt}$ en nM grâce aux pompes PMCA et SERCA. Lors de la fixation d'un ligand sur son récepteur couplé à une PLC qui clive le $PtdIns(4,5)P_2$ en DAG et $InsP_3$. Ce dernier diffuse rapidement dans le cytosol et se fixe sur son récepteur à la membrane du RE et permet la libération du Ca^{2+} des réserves. La mobilisation du Ca^{2+} à partir du RE active STIM qui migre pour aller en contact avec Orai1

b) Activation time



qui forme le pore du canal SOC à la membrane plasmique. **b)** Les propriétés et les fonctions des différents canaux calciques. Les signaux calciques générés par différents canaux avec différents temps d'activation. Par conséquent, chaque canal est responsable de réponses cellulaire distinctes (Soboloff et al., 2012).

III. CONCEPT DU STORE-OPERATED CALCIUM ENTRY (SOCE)

A. LE MODELE DU SOCE

Le concept du SOCE a été proposé par Jim Putney en 1986 ; il a remarqué qu'il existe une interconnexion entre le pool calcique intracellulaire et le pool extracellulaire. En d'autres termes, lorsque les réserves cellulaires en Ca^{2+} se vident, des canaux calciques particuliers à la membrane cellulaire s'ouvrent et permettent une entrée de calcium et le remplissage des réserves *de novo* (Putney, 1986). C'est l'inverse qui se produit dans le cœur où l'influx du Ca^{2+} est amplifié par une libération plus soutenue du Ca^{2+} à travers le canal RyR à la membrane du réticulum sarcoplasmique (RS) lors du processus excitation-contraction cardiaque (Meissner, 1994)

Il a été montré que la mobilisation des réserves calciques dans les cellules acineuses du pancréas est provoquée par l' InsP_3 , un produit soluble généré lors de la catalyse du $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ par la PLC (Streb H, 1983). L' InsP_3 agit comme un second messager et libère le calcium contenu dans le RE (Streb H, 1984). Le même processus est démontré également dans un modèle d'hépatocytes perméabilisés (Burgess Gm, 1984). Dans les cellules acineuses de la parotide, il a été montré que c'est la mobilisation du Ca^{2+} à partir du RE et non pas des mitochondries ou de vésicules membranaires, responsable de l'entrée du calcium extracellulaire qui n'est pas due à l'effet du l' InsP_3 par lui-même (Takemura H, 1989a, Takemura H, 1989b).

En 1986, Putney décrira un modèle qu'il a nommé «Entrée Capacitive» nommé SOCE actuellement, un mécanisme par lequel la mobilisation des réserves en Ca^{2+} au niveau du RE est responsable d'un influx calcique à la membrane plasmique (Putney, 1986). Ensuite, Putney présenta son nouveau modèle révisé de l'entrée capacitive du Ca^{2+} et a montré que l'activation des canaux Ca^{2+} à la membrane plasmique est une conséquence de la mobilisation du Ca^{2+} des réserves (Putney, 1990).

Un des produits les plus utilisés pour induire l'entrée capacitive du Ca^{2+} est la thapsigargine (TG). La TG est une molécule extraite d'une résine appartenant à la plante *Thapsia garganica*, elle est considérée comme un agent promoteur de tumeur (Ali H, 1985, Thastrup O, 1990). Le traitement des cellules avec la TG induit une augmentation du Ca^{2+} intracellulaire indépendamment de l'InsP₃ (Jackson Tr, 1988). Le mécanisme d'action de la TG consiste à une inhibition sélective de la pompe Ca^{2+} ATPase SERCA au niveau de la membrane du RE (Thastrup O, 1990). La TG provoque un épuisement progressif des réserves en Ca^{2+} qui activera les canaux calciques à la membrane plasmique et induire le SOCE.

B. LE COURANT CRAC (I_{CRAC})

Ensuite en 1992, les travaux de Marcus Hoth et Reinhold Penner sur les mastocytes de rat ont permis grâce à la technique de patch-clamp en configuration cellule-entière l'enregistrement d'un courant qu'ils ont ensuite appelé courant CRAC (I_{CRAC}) (Ca^{2+} -release-activated Ca^{2+}) pour désigner le courant généré lors de l'ouverture des canaux particuliers SOC (*Store operated calcium channels*) à la membrane plasmique en réponse à une baisse des concentrations du Ca^{2+} dans la lumière du RE (Hoth et Penner, 1992).

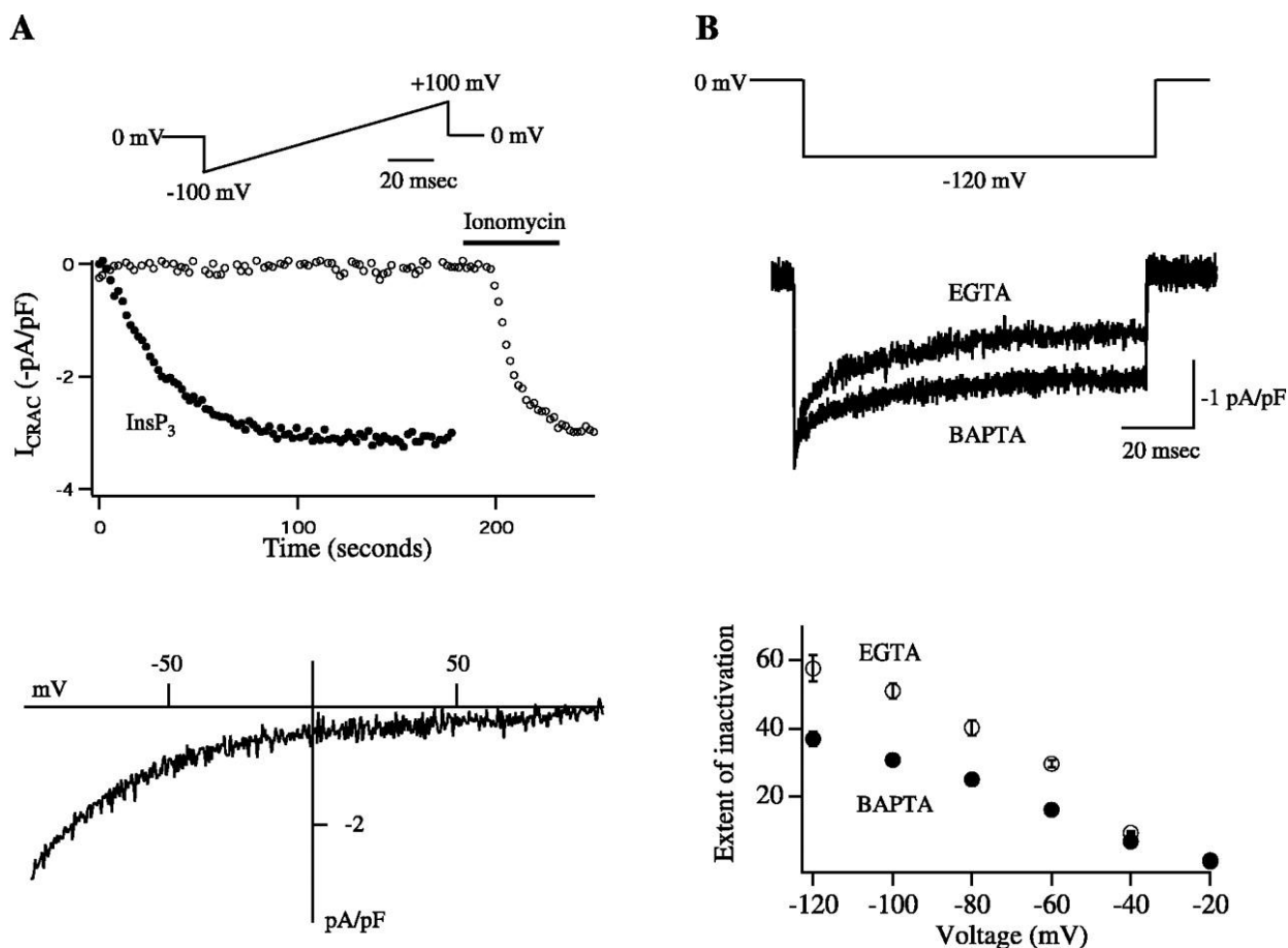


Figure 5. Propriétés biophysiques du I_{CRAC} . **A)** La cinétique du développement du I_{CRAC} enregistré en configuration cellule-entière dans la lignée RBL-1 suite à la déplétion des réserves en Ca^{2+} soit par l'InsP₃ ou avec la ionomycine introduits dans la solution intra-pipette du patch-clamp. Le protocole du voltage-clamp utilisé est présenté en haut du schéma. En bas, présentée la courbe courant(I)-voltage(V) (IV) pour I_{CRAC} . Le courant est entrant rectifiant. **B)** Une des propriétés de I_{CRAC} est la rapide inactivation Ca^{2+} -dépendante. Elle peut être révélée en appliquant un potentiel hyperpolarisant de 0 à -120 mV (en haut à droite). I_{CRAC} s'inactive rapidement dans les millisecondes qui suivent. Le taux d'inactivation est d'environ 60% lorsque le chélateur lent du Ca^{2+} , l'EGTA est introduit dans la pipette. Néanmoins, ce taux baisse à environ 40% avec le chélateur rapide, BAPTA. (en bas) présenté les taux d'inactivation enregistrés à différents voltages appliquée en présence d'EGTA ou de BAPTA (Parekh et Putney, 2005).

Le long délai dans l'activation du canal et l'apparition du I_{CRAC} , après rupture de la membrane plasmique montre que l'InsP₃ n'agit pas de manière directe sur le canal. Mais plutôt indirectement en se liant à son récepteur à la membrane du RE qui finit par mobiliser les réserves calciques. Parmi les caractéristiques biophysiques spécifiques au I_{CRAC} est sa très haute sélectivité pour le calcium par rapport aux cations monovalents (1000 :1). I_{CRAC} est un courant entrant rectifiant de très faible amplitude de l'ordre de quelques pA/pF dans les potentiels les plus négatifs (**figure 5**). I_{CRAC} a été détecté suite aux différents traitements qui ont pour but de mobiliser le Ca²⁺ à partir du RE : (1) par stimulation à l'InsP₃, (2) la chélation du Ca²⁺ par le chélateur rapide BAPTA ou avec le chélateur lent EGTA et également (3) en appliquant un ionophore calcique spécifique la ionomycine (**Hoth et Penner, 1992**). Plusieurs essais pour détecter les courants unitaires I_{CRAC} ont échoué. Les conductances des courants unitaires ont été comparées entre une stimulation du récepteur du lymphocyte T (TCR) et une mobilisation des réserves en Ca²⁺ suite au traitement par la TG. En analysant les fluctuations des courants macroscopiques générés et en calculant les moyennes et les variances du courant macroscopique, la conductance unitaire du canal CRAC a été estimée à 9 fS lors d'une exposition à 2 mM de Ca²⁺ et de 24 fS après exposition à 110 mM de Ca²⁺ (**Zweifach et Lewis, 1993**).

Comme il a été avancé dans ce chapitre, le SOCE comprend deux phases interconnectées. Bien que les voies de signalisation qui vont de l'activation de récepteurs membranaires jusqu'à la production de l'InsP₃ et par conséquent la mobilisation des réserves calciques, sont bien caractérisées, ce n'est pas le cas pour la deuxième phase qui commence de la mobilisation du Ca²⁺ jusqu'à l'ouverture de SOCs à la surface de la membrane plasmique et la génération du I_{CRAC} , une phase qui restait inconnue.

C. LE CONCEPT DU FACTEUR D'INFLUX DU Ca²⁺ (CIF)

Dans la période entre 1993 et 2005, plusieurs études ont été réalisées afin de décortiquer et comprendre le mécanisme par lequel une mobilisation du Ca²⁺ contenu dans le RE est responsable d'un influx du Ca²⁺ suite à l'ouverture de canaux à la membrane plasmique. Ainsi, est née l'idée de l'existence d'un facteur messager faisant le lien entre les deux compartiments. Randriamampita et Tsien ont été les premiers à rapporter l'existence d'un facteur spécifique qu'ils ont appelé le facteur d'influx de Ca²⁺ (CIF) qui est produit suite à une déplétion des réserves en Ca²⁺ du RE (Randriamampita et Tsien, 1993). Il a été montré que les extraits CIF produisent de l'influx du Ca²⁺ dans les cellules Jurkat et dans l'oocyte du xénope dans lesquelles les réserves en Ca²⁺ ont été épuisées (Csutora *et al.*, 1999, Thomas et Hanley, 1995). Ces extraits accélèrent également le développement de *I_{CRAC}* dans les cellules Jurkat (Csutora *et al.*, 1999). Ensuite, il a été montré que le CIF dérivé de levures et aussi de plaquettes humaines active le SOCE dans les cellules musculaires lisses de l'aorte de souris (Trepakova *et al.*, 2000) et qu'il active le canal CRAC dans la lignée de mastocytes RBL-2H3 (Su Z, 2003, Su *et al.*, 2001). Les travaux de l'équipe de Bolotina ont abouti à la découverte du mécanisme d'action du CIF et sa cible qui est la phospholipase A2 beta Ca²⁺-indépendante (iPLA₂β) (Smani *et al.*, 2004).

D. LES CANAUX TRP COMME CANDIDATS DU SOCE

En plus du concept du CIF, le rôle des canaux non sélectifs perméables au Ca²⁺ TRP (*Transient Receptor Potential*) comme des candidats potentiels du SOCE a été largement étudié par plusieurs équipes. Chez les mammifères, ces canaux formés de six DTM, perméables aux cations sont groupés en six familles basées sur leur homologie de structure en acides aminés : TRPC, TRPV, TRPM, TRPA, TRPP et enfin TRPML (Ramsey *et al.*, 2006). Les TRPC classiques (*classical* ou *canonical*) sont formés de sept membres [1-7](Trebak M, 2003).

La famille hTRPC peut être divisée en trois sous familles : TRPC3/6/7, TRPC4/5 et TRPC1. Alors que les TRPC3, TRPC6 et TRPC7 sont considérés comme responsable de l'influx calcique activé par un agoniste et indépendant des réserves en Ca^{2+} (Minke et Cook, 2002), les TRPC1 contribuent au SOCE dans plusieurs variétés de cellules comme les glandes salivaires (Liu *et al.*, 2000), les kératinocytes (Cai *et al.*, 2006), le muscle lisse (Beech, 2005), les cellules DT40 (Mori *et al.*, 2002), les HEK293 (Zagranichnaya *et al.*, 2005), les cellules neuronales (Fiorio Pla *et al.*, 2005) et les cellules intestinales (Rao *et al.*, 2006).

Dans les lignées de cellules phagocytaires HL-60, il a été montré la présence des canaux TRPC1, TRPC3, TRPC6 et Orai1. Et que l'influx SOCE est formé par Orai1, TRPC1 et TRPC6 tandis que les TRPC3 sont impliqués dans l'influx indépendant de l'état des réserves en Ca^{2+} (Brechard *et al.*, 2008)

E. ORAI ET STIM ET LE NOUVEAU CONCEPT DU SOCE

Il fallut attendre jusqu'à l'année 2005 pour que les composants moléculaires du SOCE soient découverts. Tout d'abord, les senseurs du Ca^{2+} contenu dans le RE appelés STIM1 et STIM2 ont été découverts (Roos, 2005, Liou *et al.*, 2005). Dans la même période, deux équipes ont pu grâce à la technique d'interférence par l'ARN (RNAi) de mettre en évidence STIM comme un senseur du Ca^{2+} dans la lumière du RE.

Dans les cellules de Drosophiles S2, et par RNAi, après un criblage de plusieurs gènes candidats comme constituants du SOCE, il a été démontré que la non expression du gène *stim* interfère de façon importante avec le SOCE des cellules de Drosophiles et supprime complètement le *ICRAC*. Ces résultats ont été confirmés par une inhibition importante de l'influx SOCE induit par la TG dans les cellules Jurkat et les cellules HEK293 et également une suppression du *ICRAC* dans les cellules Jurkat des lymphocytes T (Roos, 2005).

En même temps, Liou *et al* ont pu découvrir STIM1 et STIM2 comme deux potentiels composants du SOCE lorsque les cellules de lignée épithéliale humaine HeLa ont été transfectées avec des petits ARN interférents (siRNA) dirigés contre STIM1 ou STIM2. Leurs résultats montrent une inhibition très importante de l'influx SOCE induit par un agoniste, l'histamine ou par la TG. Ils ont montré aussi que STIM1 co-localise dans des régions appelées puncta au niveau du RE. Ils ont conclu par la suite que les protéines STIM agissent comme un senseur des ions de Ca^{2+} dans le compartiment intra-luminal du RE (Liou *et al.*, 2005).

Après la découverte de STIM et la caractérisation de son rôle de senseur du Ca^{2+} au niveau du RE, une autre protéine a été découverte très peu après. Grâce à l'utilisation de la technique génétique (*modified linkage analysis with single-nucleotide polymorphism*) chez des patients souffrant d'une immunodéficience sévère combinée (SCID) et en la combinant avec la RNAi chez les Drosophiles, Feske *et al* ont découvert une nouvelle molécule qu'ils ont nommé « Orai1 », une protéine cruciale pour le SOCE des lymphocytes T. Chez les parents des patients SCID, une réduction de 50% de l'influx SOCE induit par la TG a été constatée par rapport aux sujets normaux. Cette réponse est due à la présence d'une mutation ponctuelle par remplacement d'une arginine (R) par un tryptophane (W) à la position 91 (R91W) au niveau du gène codant pour Orai1. La surexpression d'Orai1 non muté dans les cellules T SCID déficientes en influx SOCE a permis de restaurer un influx SOCE normal, sensible à une inhibition par les inhibiteurs du SOCE comme le lanthane La^{3+} à 2 μM et le 2-aminoéthoxydiphényl borate (2-APB) à 75 μM , et activé par le 2-APB à 3 μM . Ces résultats ont été confirmés sur le I_{CRAC} mesuré avec la technique du patch clamp où une restauration du I_{CRAC} a été enregistrée dans les cellules SCID transfectées avec un gène Orai1 fonctionnel (Feske *et al.*, 2006).

Dans la même période, grâce à la combinaison de la RNAi chez la Drosophile et le criblage à haut débit, Vig *et al*, ont montré que l'inactivation de deux molécules nommées CRACM1 et CRACM2 (correspondant à Orai1 et Orai2) inhibait l'influx

SOCE induit par la TG. Ces résultats ont été confirmés sur le courant I_{CRAC} . Egalement, la transfection des cellules HEK293 et Jurkat avec les siRNA dirigés contre CRACM1 et CRACM2 réduisait l'influx SOCE et inhibait le I_{CRAC} (Vig *et al.*, 2006).

Une autre étude utilisant la RNAi chez la Drosophile S2 montre que la non expression de *olf186-F* (Orai1) supprime le I_{CRAC} alors que la surexpression de *olf186-F* dans ces cellules augmente l'amplitude du I_{CRAC} . Cet effet est amplifié sur le I_{CRAC} lors de la co-expression de STIM et *olf186-F* (Zhang *et al.*, 2006). Il a été montré que les propriétés de I_{CRAC} dépendent de l'expression relative d'Orai1 et de STIM1 dans les systèmes hétérologues. En effet, lorsque le ratio Orai1 :STIM1 augmente de 1 :4 à 4 :1, l'inactivation rapide de I_{CRAC} due au Ca^{2+} est fortement réduite et la potentialisation par le 2-APB est augmenté (Scrimgeour *et al.*, 2009).

Dans les cellules HL-60 différenciées en phagocytes, il a été montré que Orai1 et STIM1 sont nécessaires à la fois pour induire l'influx calcique médié par les récepteurs $Fc\gamma$ et pour la production de FRO phagosomales (Steinckwich *et al.*, 2011).

1. ORAI

Orai1 est une protéine de la membrane plasmique, composé de 301 acides aminés avec une masse moléculaire d'environ 33 kDa. Elle est composée de quatre DTM (Feske, 2007) (figure 6), les deux extrémités amino et carboxy-terminales sont cytosoliques. Il existe une forte évidence d'un assemblage des sous-unités d'Orai1 en tétramère (Mignen *et al.*, 2008, Ji *et al.*, 2008, Penna *et al.*, 2008). Mais récemment, la structure cristalline d'Orai a été résolue et il a été montré que l'assemblage des sous-unités d'Orai se fait plutôt en hexamère (Hou *et al.*, 2012) Il a été démontré que le Glutamate en position 106 au niveau du DTM1 et la Glutamate en position 190 du DTM3, sont impliqués la perméabilité et la sélectivité des ions du Ca^{2+} (Prakriya *et*

al., 2006, Yeromin *et al.*, 2006). Par ailleurs, une mutation R91W sur le DTM1 a été associée avec une SCID (Feske *et al.*, 2006).



Figure 6. Structure de Orai1. Orai1 est une protéine de la membrane plasmique composée de 4 DTM (M1-M4) et deux moitiés N et C-terminales cytosoliques. Le site Arg91Trp est muté chez les patients souffrant de SCID responsable de la perte de fonction du canal CRAC. Deux résidus Glutamate conservés (Glu106 et Glu190) et 3 Aspartates impliqués dans la perméabilité du canal CRAC au ions Ca^{2+} (Feske, 2007).

Lors de la déplétion des réserves en Ca^{2+} du RE, Orai1 se distribue vers des sites appelés puncta sur la membrane plasmique pour être en contact avec les protéines STIM1 (Luik *et al.*, 2006).

Chez les mammifères, en plus de l'expression d'Orai1, il existe deux homologues Orai2 et Orai3. Tous ces trois protéines sont constituées d'un domaine C-terminal conservé, mais seulement Orai1 possède un domaine riche en proline et arginine au niveau de l'extrémité N-terminale (Frischauf *et al.*, 2009). Il a été montré que la surexpression de Orai2 et Orai3 avec STIM1 induit un influx SOCE, mais d'une

amplitude plus faible que celui induit par la surexpression de Orai1 et STIM1 (Lis *et al.*, 2007). plusieurs études ont montré qu'Orai3 constitue le SOCE natif des cellules du cancer de sein exprimant les récepteurs à l'œstrogène (Motiani *et al.*, 2010, Faouzi *et al.*, 2011, Faouzi *et al.*, 2013).

La particularité de Orai3 est sa capacité d'ouverture lors du traitement avec le 2-APB à fortes concentrations (30 μ M) et ceci indépendamment de STIM. Par ailleurs, le 2-APB provoque l'augmentation de la taille du pore et la perte de la sélectivité pour le Ca^{2+} (Dehaven *et al.*, 2008, Zhang *et al.*, 2008, Peinelt *et al.*, 2008).

2. STIM

STIM1 est une protéine transmembranaire composée de 685 acides aminés. Selon sa glycosylation post-traductionnelle, elle est située soit à la membrane du RE ou à la membrane plasmique (Williams *et al.*, 2001).

STIM1 possède une partie intraluminale d'environ 22 kDa, un seul DTM et une partie cytosolique d'environ 51 kDa. STIM1 fonctionne comme senseur du Ca^{2+} au niveau de la lumière du RE (Hogan *et al.*, 2010). L'extrémité N-terminale de STIM1 est dirigée vers la lumière du RE et contient un domaine qui lie le Ca^{2+} nommé *EF-hand* qui fonctionne comme un senseur du Ca^{2+} . L'affinité du domaine EF-SAM pour le Ca^{2+} est faible, la constante de dissociation est de l'ordre de 0,2-0,6 mM (Stathopoulos *et al.*, 2006). Ce domaine est suivi d'un domaine SAM (*Sterile α -motif*) et d'un domaine transmembranaire (DTM). A l'extrémité C-terminale, on retrouve le domaine SOAR (*STIM-Orai activating region*) dont le rôle est d'activer les canaux Orai. Un domaine riche en résidus acides qui est impliqué dans la phase d'inactivation rapide par le Ca^{2+} (*FI Fast inactivation*). Un domaine régulateur de la fonction de STIM1 au cours du cycle cellulaire et enfin un domaine riche en Lysine (*K Rich*) qui contribue à la localisation de STIM1 au niveau des puncta en interagissant avec les lipides acides membranaires (Liou *et al.*, 2007) (figure 7).

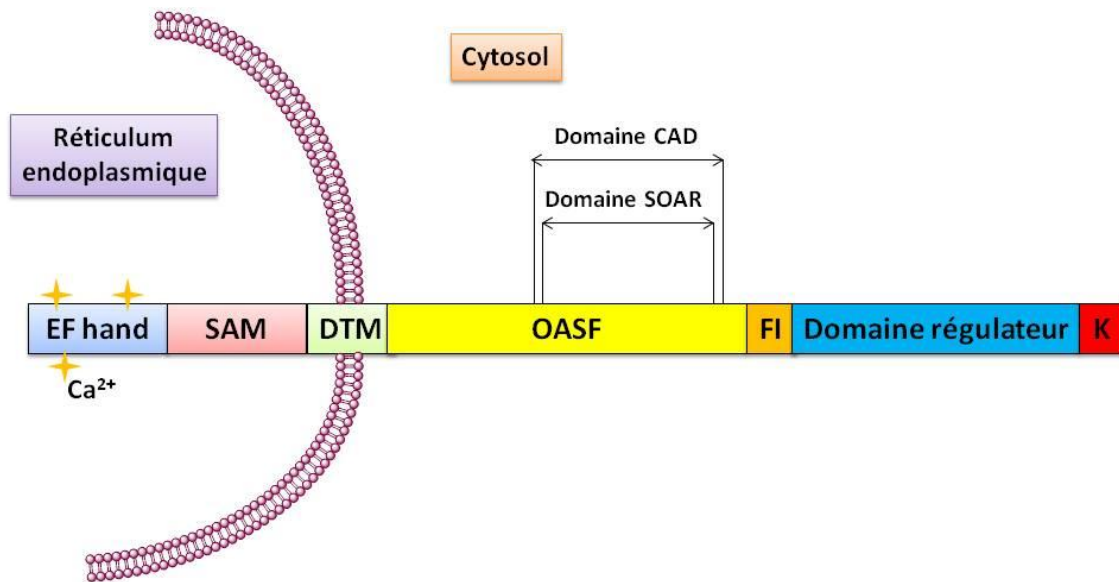


Figure 7. Structure de STIM1

Chez l'homme, il existe une protéine STIM2 homologue à STIM1. Dans la majorité des tissus, le niveau d'expression de STIM1 est plus élevé que STIM2. Néanmoins, STIM2 est plus exprimée dans le cerveau et dans les cellules dendritiques (**Soboloff et al., 2012**). STIM1 et STIM2 possèdent une très forte homologie et elles ne sont variables qu'au niveau des extrémités amino et carboxy-terminales (**Deng et al., 2009**)

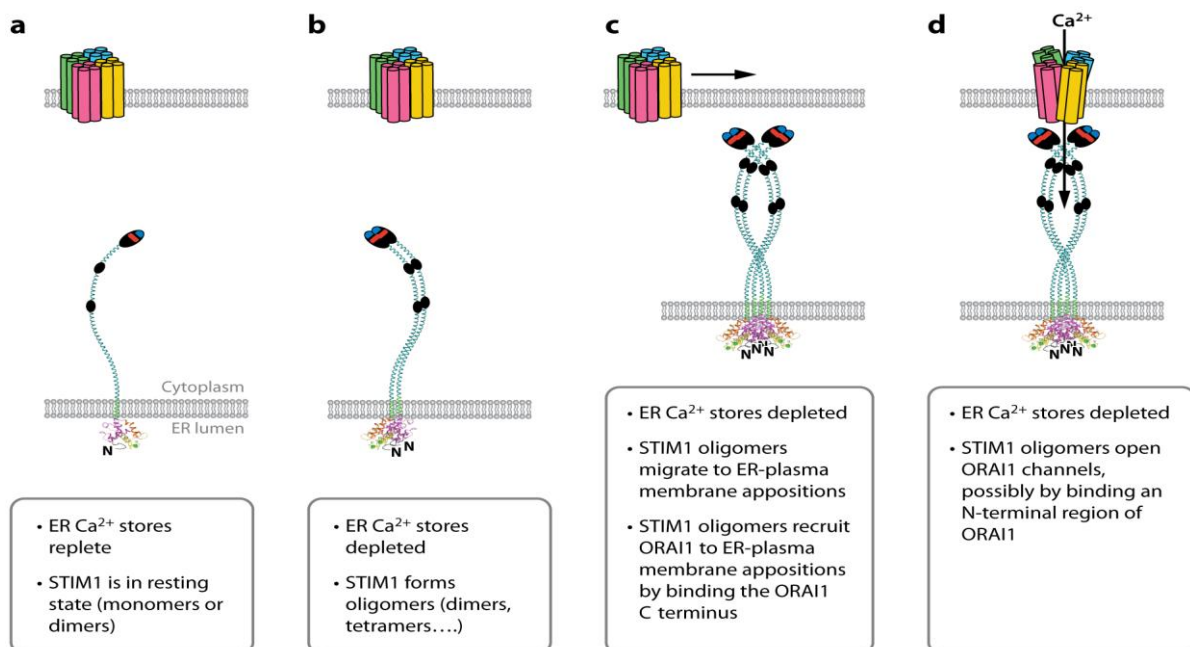
Le rôle de STIM2 n'est pas encore bien élucidé. Des études ont montré qu'à l'inverse de STIM1, STIM2 supprime le SOCE et agit plutôt comme régulateur. Plus tard, il a été montré que STIM2 maintient les concentrations calciques cytosoliques basales et qu'elle est plus sensible aux changements de concentrations calciques dans la lumière

du RE pour activer l'influx calcique (**Brandman *et al.*, 2007**). Dans les cellules HL-60 différenciées en phagocytes, il a été montré que la présence de STIM1 et non pas STIM2 est indispensable pour produire un influx SOCE qui est nécessaire pour l'activation de la NADPH oxydase et la production de FRO (**Brechard *et al.*, 2009**).

3. INTERACTION STIM-ORAI ET L'ACTIVATION DU CANAL ORAI

Une évidence directe que STIM1 dimérise et oligomérisé lors de la déplétion des réserves en Ca^{2+} a été démontré par la technique du FRET (*Fluorescence resonance energy transfer*). Cette étape précède l'apparition des puncta adjacentes à la membrane plasmique (**Hogan *et al.*, 2010**).

Après son oligomérisation, les protéines STIM1 migrent vers les jonctions de contact entre ER et membrane plasmique où les protéines Orai sont recrutées, ce qui permet leur ouverture au niveau de ces jonctions (**figure 8**) (**Liou *et al.*, 2007**).



AR Hogan PG, et al. 2010.
Annu. Rev. Immunol. 28:491–533

Figure 8. Etapes d'activation d'Orai1. a) Orai1 et STIM1 à l'état de repos lorsque les réserves en Ca^{2+} sont remplies. b) Oligomérisation de STIM1 suite à une déplétion des réserves dans le RE. c) Après son oligomérisation, les protéines STIM1 migrent vers les jonctions de contact ER-membrane plasmique où Orai1 est alors recruté par sa région C-terminale. d) les oligomères de STIM1 ouvrent les canaux Orai1 et influx du Ca^{2+} (**Hogan *et al.*, 2010**).

Les régions essentielles à la liaison STIM1-Orai et l'activation de CRAC consistent en résidus cytosoliques 233-450 de STIM1 appelés OASF pour (*Orai1 activating small fragment*) (Muik *et al.*, 2009), les résidus 342-448 nommés CAD pour (*CRAC activating domain*) (Park *et al.*, 2009) et enfin les résidus 344-443 appelés SOAR (*STIM1-Orai1 activating region*) (figure 7) (Yuan *et al.*, 2009).

F. PHARMACOLOGIE DU SOCE

Plusieurs médicaments à base d'inhibiteurs de canaux calciques sont utilisés en thérapeutique cardiovasculaire. En revanche, jusqu'à maintenant aucune molécule ciblant le SOCE n'a été utilisée en thérapeutique malgré les grands progrès enregistrés afin de comprendre le mécanisme du SOCE surtout à la suite de la découverte des composants clés Orai et STIM (Sweeney *et al.*, 2009).

Malgré la multitude d'outils pharmacologiques disponibles actuellement pour étudier le SOCE, le plus grand inconvénient est leur non spécificité. Parmi ces molécules nous pouvons citer : les imidazolés (exemple l'éconazole), les esters de Bore (2-APB), et les lanthanides (La^{3+} , Gd^{3+}). Ces produits en plus de leur action inhibitrice sur le SOCE, ils inhibent également aux mêmes concentrations d'autres types de canaux comme les canaux Cl^- (Franzius *et al.*, 1994).

1. LES CATIONS TRIVALENTS

L'influx SOCE a la particularité d'être inhibé par les cations trivalents comme le lanthane (La^{3+}) et le Gadolinium (Gd^{3+}). Le La^{3+} a été caractérisé comme le plus puissant inhibiteur du I_{CRAC} dans des mastocytes de rat (Hoth et Penner, 1993).

Le Gadolinium (Gd^{3+}) est un des inhibiteurs du I_{CRAC} les plus utilisés. Son action a été mise en évidence pour la première fois dans les thymocytes de souris (Ross et

Cahalan, 1995). Il a été également utilisé comme un outil de distinction entre le SOCE endogène des cellules et le SOCE induit par les TRPC transfectées dans les cellules. Ces dernières sont insensibles à son effet inhibiteur du SOCE (**Trebak et al., 2002**). Ces cations trivalents inhibent le SOCE à des concentrations de l'ordre de micromolaire (μM).

2. ML-9

Parmi les molécules inhibitrices du SOCE, ML-9 (1-(5-chloronaphthalene-1-sulfonyl)homopiperazine, HCl) (**figure 9**), qui a été initialement rapporté comme un inhibiteur de la MLCK (*Myosin Light Chain Kinase*) (**Saitoh et al., 1987**). Il a été montré que ML-9 inhibe le SOCE induit par la TG dans plusieurs cellules (**Watanabe et al., 1998, Norwood et al., 2000, Smyth et al., 2008, Dehaven et al., 2009**). Dans les neutrophiles humains, il a été montré que le ML-9 inhibe l'influx calcique induit par la TG mais non celui induit par la stimulation par le fMLF (**Salmon et Ahluwalia, 2010a**). Bien que le mécanisme d'inhibition de ML-9 sur le SOCE n'est pas bien connu, il existe une évidence d'une interaction directe de ML-9 avec STIM1 ce qui empêche son réarrangement au niveau des puncta (**Smyth et al., 2008**).

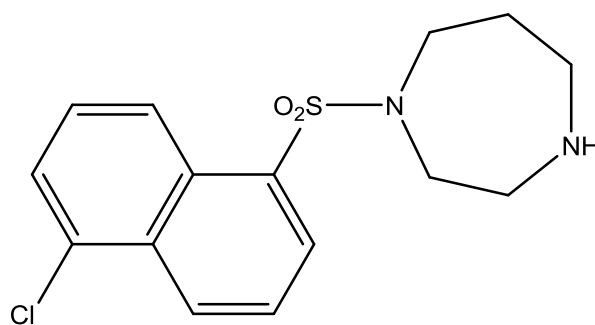


Figure 9. Structure du ML-9. Dessinée par le logiciel
ChemBioDraw Office 2012

3. DERIVES DE PYRAZOLE

Un dérivé de pyrazole désigné BTP2 (3,5-bistrifluorométhyl pyrazol) (**figure 10**) a été caractérisé au départ comme un puissant inhibiteur de l'activation du NFAT (*Nuclear of activated T cell*) et de la production de cytokines (**Trevillyan et al., 2001**). Ensuite, il a été montré comme un puissant inhibiteur du SOCE et du *I_{CRAC}* dans les lymphocytes T (**Ishikawa et al., 2003, Zitt et al., 2004**). Dans les neutrophiles, le BTP2 inhibe l'influx SOCE induit par TG et par le fMLF et réduit de 82% la production de FRO sans affecter la phagocytose ou la production de radicaux libres oxygénés intraphagosomiaux (**Steinckwich et al., 2007**).

Le BTP2 n'est pas spécifique du SOCE car il active également les TRPM4 et courant calcique correspondant. En plus d'une inhibition du *I_{CRAC}*, le BTP2 à 10 μ M augmente 100 fois l'amplitude du courant calcique dû aux TRPM4 (**Takezawa et al., 2006**).

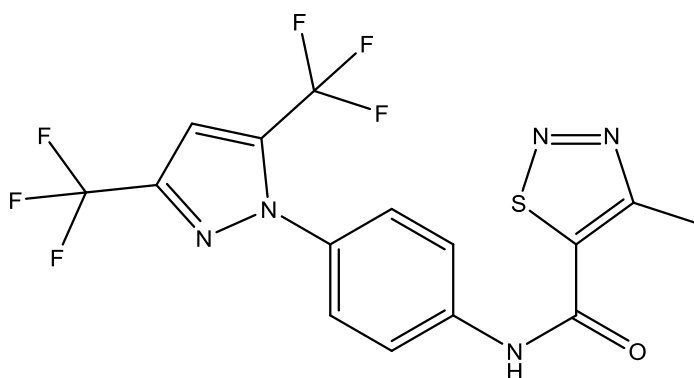


Figure 10. Structure du BTP2.

4. DERIVES IMIDAZOLES

Un des premiers inhibiteurs de CRAC qui est largement utilisé est un composé antifongique le SKF-96365 (**figure 11**). Il bloque le SOCE dans différents types cellulaires (**Parekh, 2010**). Un autre dérivé imidazolé inhibiteur du SOCE l'éconazole est utilisé pour la caractérisation de *I_{CRAC}* (**Franzius et al., 1994**).

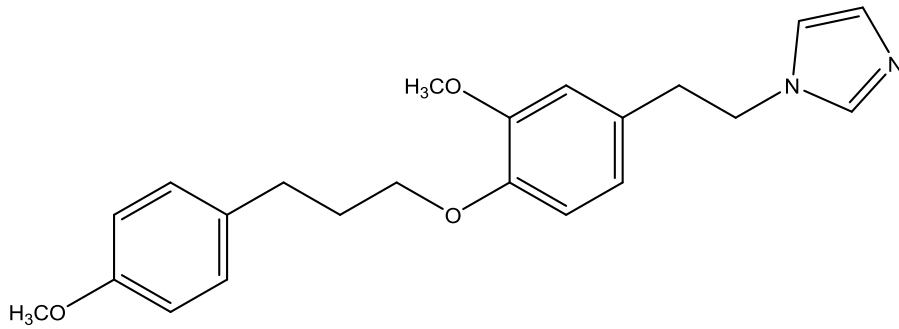


Figure 11. Structure du SKF-96365.

5. LE 2-AMINOETHOXYDIPHENYL BORATE

a) STRUCTURE ET ACTIVITE

Le 2-aminoethoxydiphényl borate ou le 2-aminoethyl diphénylborinate (2-APB) (**figure 12**), un composé perméable a été décrit initialement comme un inhibiteur de l'activité du récepteur à l'InsP₃ dans les microsomes cérébraux de rat.

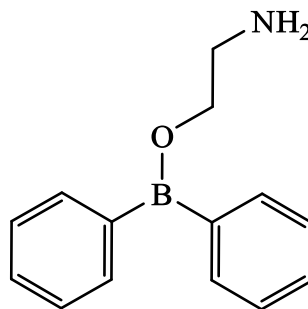


Figure 12. Structure du 2-APB

Il inhibe de manière dose-dépendante l'ouverture du canal sans affecter la liaison de l'InsP₃ à son récepteur (**Maruyama et al., 1997**). En même temps il a été rapporté que le 2-APB inhibe partiellement l'activité Ca²⁺-ATPase des pompes SERCA (**Maruyama et al., 1997**). Une étude dans les cellules musculaires lisses A7r5 montre que le 2-APB

n'est pas spécifique des InsP₃R car il inhibe les pompes Ca²⁺-ATPases et augmente la fuite non spécifique du Ca²⁺ des réserves (*leak*) (Missiaen *et al.*, 2001). Chez la drosophile, le traitement des cellules mutées dans le gène *trp*, l'équivalent du gène TRP chez les mammifères, avec de fortes concentrations du 2-APB (500 μM) inhibe les réponses des cellules de la rétine (Ma *et al.*, 2001) sachant que l'activation des canaux TRP est normale lors de stimulation par la lumière des Drosophiles en absence de InsP₃R (Faurischou et Borregaard, 2003). En revanche, dans des hépatocytes de rat, le 2-APB inhibait l'influx SOCE induit par la TG sans avoir un effet sur les récepteurs à InsP₃. L'effet direct sur I_{CRAC} a été montré également en patch-clamp sur une lignée d'hépatome de rat H4-IIE (Gregory *et al.*, 2001).

Il a été montré que la présence des récepteurs à l'InsP₃ n'est pas nécessaire pour l'activation du SOCE (Ma *et al.*, 2001, Gregory *et al.*, 2001). Egalement dans des lignées DT40 où les gènes codants pour les trois types de récepteurs à l'InsP₃ ont été invalidés (DT40KO pour InsP₃Rs), le I_{CRAC} induit par TG avait les mêmes propriétés et il est comparable à celui obtenu dans les cellules DT40 normales (Prakriya et Lewis, 2001, Broad *et al.*, 2001).

Il a été rapporté que le 2-APB peut exister sous différentes formes : sous forme d'un monomère, une forme monomère mais avec un cycle qui se forme par liaison de l'atome d'azote (N) avec le Bore (B) formant un 3^{ème} cycle par une coordination interne. Une forme pentacyclique avec la formation d'un dimère de deux 2-APB liés par des coordinations externes (**figure 13**) (Dobrydneva et Blackmore, 2001).

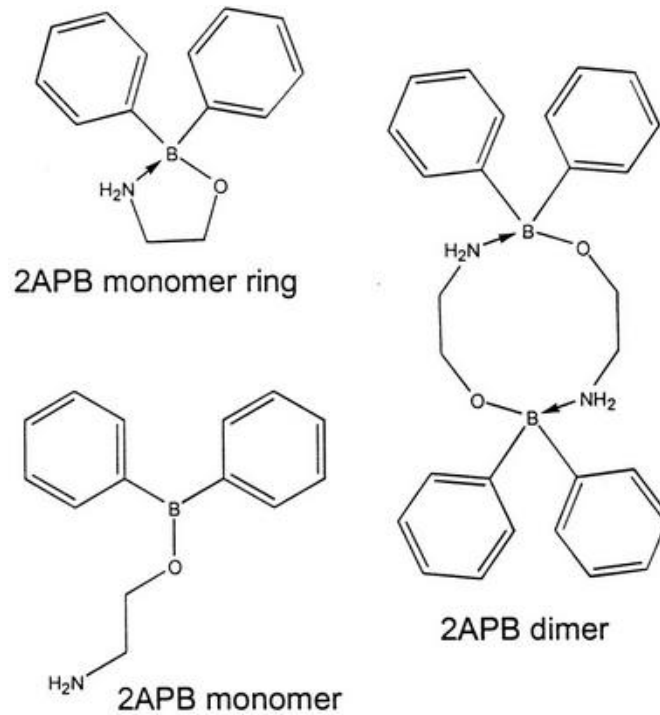


Figure 13. Les différentes formes de 2-APB

b) INTERET DU 2-APB

A faibles concentrations (1-5 μM) le 2-APB potentialise I_{CRAC} dans les cellules Jurkat des lymphocytes T. En revanche, l'inhibition de I_{CRAC} est observée à de fortes concentrations. A faibles concentrations le 2-APB accélère la phase d'inactivation rapide du I_{CRAC} due au Ca^{2+} probablement par augmentation de la concentration du Ca^{2+} local (Prakriya et Lewis, 2001).

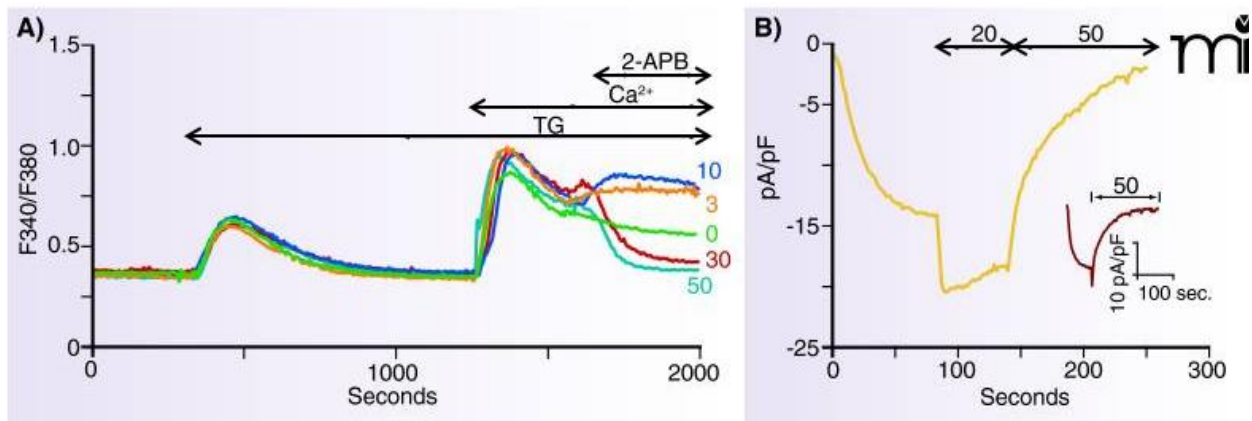


Figure 14. Effet biphasique du 2-APB sur I_{CRAC} . A) Dans les cellules HEK293, le 2-APB 3 μM ou 10 μM potentialisent le SOCE tandis que 30 ou 50 μM l'inhibent. B) Dans les cellules HEK293 surexprimant Orai1 et STIM1, l'amplitude du I_{CRAC} est augmentée par le 2-APB 20 μM alors qu'elle est inhibée par 50 μM (Putney, 2010).

L'intérêt du 2-APB est sa capacité de potentialiser à faibles concentrations et d'inhiber à fortes concentrations le SOCE (figure 14), cette double activité fait du 2-APB l'outil de caractérisation le plus largement utilisé. Néanmoins, en plus de son action sur le SOCE, le 2-APB inhibe également les InsP_3R avec une constante d'inhibition IC_{50} de 42 μM (Maruyama *et al.*, 1997), SERCA (Missiaen *et al.*, 2001), TRPC3 (Trebak *et al.*, 2002).

Le 2-APB active également TRPV1, TRPV2 et TRPV3 avec des concentrations efficaces EC_{50} de $114 \pm 8 \mu\text{M}$, $129 \pm 13 \mu\text{M}$ et $34 \pm 12 \mu\text{M}$ respectivement (Hu *et al.*, 2004) et il a une double activité sur TRPM7 avec une potentialisation à des concentrations de l'ordre des (100 μM) et une inhibition à partir de 1 mM (Li *et al.*, 2006).

Afin d'améliorer la spécificité et l'efficacité de la molécule du 2-APB, plusieurs équipes se sont intéressées à la recherche de nouvelles molécules analogues du 2-APB. Lors d'un criblage de 600 molécules analogues du 2-APB, deux puissants inhibiteurs du SOCE : DPB162-AE et DPB163-AE ont été caractérisés (figure 15) (Zhou *et al.*, 2007). Ces deux composés inhibent le SOCE des cellules Jurkat avec des

IC₅₀ de 0,32 μM et 0,43 μM pour DPB162-AE et DPB163-AE respectivement (Suzuki *et al.*, 2010). Leurs effets inhibiteurs ont été ensuite confirmés sur I_{CRAC} des cellules HEK293 co-exprimant Orai1 et STIM1 ; le DPB162-AE et DPB163-AE inhibent I_{CRAC} avec des IC₅₀ de 86 ± 21 nM et 170 ± 68 nM respectivement (Goto *et al.*, 2010).

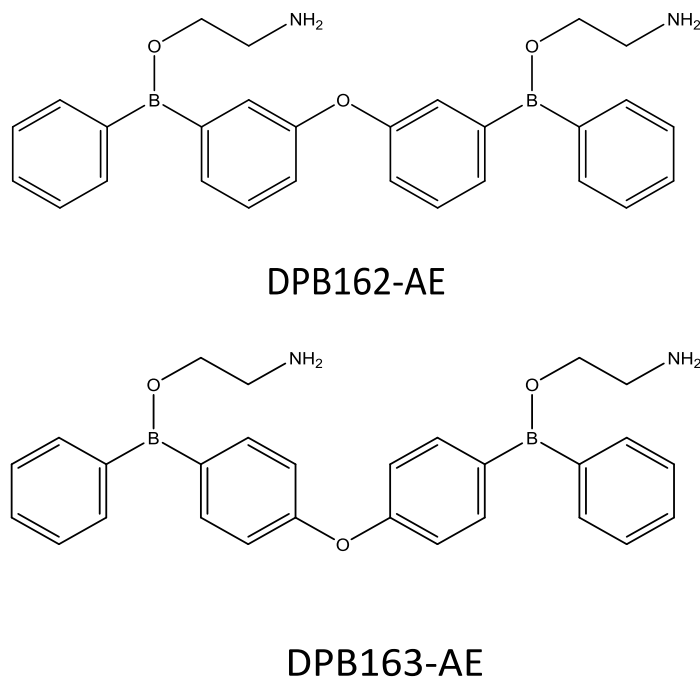


Figure 15. Structures du DPB162-AE et DPB163-AE

IV. OBJECTIFS DE LA THESE

L'objectif principal de la thèse est la caractérisation des voies d'entrée du Ca²⁺ dans les PMN et ensuite établir leurs rôles dans les principales activités des neutrophiles comme la phagocytose, la production de FRO, le chimiotactisme et la dégranulation.

Nous avons utilisé comme modèle d'étude des cellules PLB-985 différenciées en cellules proches de neutrophiles.

A. CARACTERISATION DE NOUVEAUX OUTILS

PHARMACOLOGIQUES

Pour étudier la place du SOCE dans la signalisation calcique des cellules PLB-985, il est nécessaire dans un premier temps de mettre en place des outils plus spécifiques et efficaces que le 2-APB, la molécule la plus utilisée actuellement. Cette caractérisation pharmacologique a été faite sur une lignée de lymphocytes T qui est la lignée des cellules Jurkat. Ceci présente un avantage considérable du fait que l'influx calcique SOCE des lymphocytes T dû à Orai1 est le mieux caractérisé jusqu'à maintenant.

Le 2-APB, depuis son introduction en signalisation calcique (**Maruyama et al., 1997**) est la molécule la plus utilisée pour caractériser le SOCE surtout grâce à sa double activité à fortes et à faibles concentrations. En revanche, elle agit sur plusieurs cibles cellulaires qui font de ce composé une molécule non spécifique. Dans le but de déterminer quelle partie de la molécule est nécessaire à la potentialisation et/ou l'inhibition, une étude récente de notre équipe a montré que le cœur (Bore-Oxygène-Carbone) désigné par BOC est une nécessité absolue à la potentialisation du SOCE. Tandis que les deux phényles jouent plutôt un rôle dans l'inhibition. Ceci a été démontré dans trois lignées différentes de leucocytes (**Dellis et al., 2011**).

Le but de cette première étape est de caractériser à partir du 2-APB comme molécule de référence, des analogues plus efficaces et plus spécifiques, qui serviront d'outils de caractérisation du SOCE dans les cellules leucocytaires. Nous avons obtenu des analogues commerciaux du 2-APB qui présentent des modifications au niveau des deux phényles. Et nous avons étudié leurs effets sur le SOCE des cellules Jurkat.

B. CARACTERISATION DE L'INFLUX SOCE DES PLB-985

Dans cette deuxième étape, nous allons procéder à l'étude de la voie d'entrée calcique SOCE dans notre modèle cellulaire PLB-985 tout en intégrant les analogues caractérisés dans l'étape 1.

Le SOCE sera induit suite aux différentes stimulations par la TG et également par des peptides chimio-attractants comme le fMLF et le WKYMVm. Les effets du 2-APB et ses analogues caractérisés dans les cellules T Jurkat seront également étudiés sur le SOCE.

C. ANALOGUES DE 2-APB ET FONCTIONS DES PLB-985

Enfin, l'étape finale est d'étudier les effets des analogues sur le SOCE des PLB-985 différenciées en cellules proches de neutrophiles. Ainsi que ses conséquences sur leur fonctionnement cellulaire en particulier la production de FRO et la phagocytose des levures. La phagocytose des levures par les cellules PLB-985 différenciées et la production de FRO intra-phagosomales seront étudiées grâce à la cytométrie en flux. Par ailleurs, la mesure des FRO produites au niveau extracellulaire est réalisée par chimiluminescence.

MATERIEL
ET
METHODES

MATERIEL ET METHODES

V. CULTURE CELLULAIRE

A. LIGNEE JURKAT

La lignée de cellules Jurkat E6.1 est une lignée de cellules provenant du sang périphérique d'un enfant de 14 ans souffrant d'une leucémie aigüe à lymphocytes T (Schneider *et al.*, 1977). Ces cellules ont été maintenues dans un milieu RPMI-1640 (Lonza, Verviers, Belgique) supplémenté de 10% de sérum de veau foetal (SVF) et 2 mM de la L-Glutamine (Invitrogen, Cergy-pontoise, France). Elles ont été incubées à 37°C dans une atmosphère humidifiée avec 5% de CO₂. Le repiquage des cellules Jurkat se fait deux fois par semaine pour maintenir la densité cellulaire entre 0,2. 10⁶ et 2. 10⁶/ml.

B. LIGNEE PLB-985

La lignée cellulaire myéloïde humaine PLB-985 provient de chez Dr Marie-José Stasia, CHU de Grenoble, France avec l'autorisation du Dr Mary Dinauer, Indiana University school of medicine, Indianapolis, IN, Etats-Unis. Les cellules PLB-985 ont pour origine le sang périphérique d'une femme de 38 ans souffrant d'une leucémie aigüe myéloblastique réfractaire non lymphocytaire. L'intérêt de cette lignée est la capacité des cellules à se différencier vers des stades matures de granulocytes ou monocytes/macrophages selon le type de traitement induit (Tucker *et al.*, 1987). Le travail notamment de Pedruzzi a achevé cette caractérisation en montrant les conséquences fonctionnelles de cette différenciation en cellules mimant les fonctions des neutrophiles suite aux diverses stimulations physiologiques comme :

1. La réponse oxydative par production des anions superoxydes (O_2^-)

2. Le processus de dégranulation avec génération de granules azurophiles produites suite à la sensibilisation des neutrophiles « phénomène de *priming* » suivie par les granules spécifiques et les gélatinases et enfin les vésicules sécrétoires (Wright *et al.*, 2010, Pedruzzi *et al.*, 2002).

1. CROISSANCE DES PLB-985

Les cellules PLB-985 ont été maintenues dans le milieu RPMI-1640 supplémenté de 10% de sérum de veau fœtal (SVF), 2 mM de la L-Glutamine, 100 U/mL de pénicilline, 100 µg/mL de la streptomycine et 0,25 µg/mL d'Amphotéricine B. Elles sont incubées à 37°C dans une atmosphère humidifiée avec 5% de CO₂. Le repiquage des cellules se fait deux fois par semaine pour maintenir la densité cellulaire entre 0,2. 10⁶ et 2. 10⁶/ml.

2. DIFFERENCIATION DES PLB-985

Les PLB-985 ont été différenciées en cellules proches de neutrophiles qui sont capables à la fois de phagocyter les particules et produire des formes réactives de l'oxygène (FRO). Cette différenciation vers la voie granulocytaire est réalisée en incubant les cellules en présence de 1,25 % de diméthyl sulfoxyde (DMSO, Sigma-Aldrich) dans le milieu de culture. Le jour de la différenciation correspond à J₀, et les expériences ont été réalisées à J₅ ou J₆ correspondant au stade mature des PLB-neutrophiles. Le milieu de culture est changé en J₂ ou J₃ (Pedruzzi *et al.*, 2002).

VI. MESURE DES CONCENTRATIONS DU CALCIUM CYTOSOLIQUE

Les mesures de la [Ca²⁺]_{cyt} ont été réalisées par une technique spectrofluorimétrique. Les cellules ont été centrifugées à 377 g pendant 5 min pour éliminer le milieu de culture. Ensuite elles ont été resuspendues dans un tampon PBS (*Phosphate Buffer Saline*, Cambrex, Belgique) supplémenté de 1 mg/ml d'Albumine du sérum bovin

(ASB) (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France). Les cellules ont été chargées en présence de 2 mM de CaCl₂ avec 4 μM de indo-1-AM ou Fura-2-AM selon les expériences (Invitrogen Molecular Probes, Eugene, Etats-Unis), des sondes fluorimétriques perméables. Les cellules ont été chargées pendant une heure à température ambiante avec la sonde fluorescente sous sa forme ester acétoxy méthyl, à l'abri de la lumière et sous faible agitation. La sonde diffuse à travers la membrane et elle est clivée par les estérases intracellulaires pour générer ensuite la sonde fluorescente. Ensuite, pour éliminer les sondes restant à l'extérieur des cellules, ces dernières ont été lavées deux fois avec un tampon Hepes sans calcium (*Hepes Buffered Saline*, HBS) dont la composition en mM est la suivante : 135 NaCl, 5.9 KCl, 1.2 MgCl₂, 11.6 Hepes, 11.5 glucose, pH à 7.3 ajusté avec une solution de NaOH 1M.

Pour procéder à la mesure de la $[Ca^{2+}]_{cyt}$, 10⁶ de cellules sont diluées dans un volume final de 2 mL et déposées dans une cuvette en quartz (Hellma® Fluorescence cuvettes, Sigma-Aldrich, France). La cuvette est insérée dans un spectrofluorimètre (VARIAN® Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer) relié à un bain marie pour maintenir les cellules à 37°C. Le spectrofluorimètre est piloté par le logiciel Cary Eclipse Kinetics Applications. Pour maintenir les cellules en suspension en cuvette, un agitateur aimanté est placé au fond de la cuvette.

Après une excitation à 360 nm de la sonde Indo-1, les émissions de la fluorescence à 405 nm (calcium lié à l'indo-1) et à 485 nm (calcium libre) sont enregistrées. Ensuite, les concentrations intracellulaires en calcium $[Ca^{2+}]_{cyt}$ sont calculées selon l'équation de Grynkiewicz: $[Ca^{2+}]_{cyt} = K_d \times \frac{F_{405max}}{F_{485min}} \times \frac{R - R_{min}}{R_{max} - R}$ (Grynkiewicz *et al.*, 1985).

Le K_D est la constante de dissociation du complexe indo-1~Ca²⁺ = 230 nM à 37°C, R est le ratio F_{405}/F_{485} , R_{max} est le ratio de la fluorescence lorsque la sonde indo-1 est saturée par un excès de calcium extracellulaire (10 mM de CaCl₂) en présence d'un ionophore (ionomycine 1μM). Le R_{min} est le ratio calculé dans les conditions

minimales de $[Ca^{2+}]_{cyt}$ en ajoutant dans la solution de l'EGTA à 10 mM, un chélateur de Ca^{2+} et du Triton 100X.

Pour les expériences réalisées avec la sonde Fura-2, les cellules sont excitées à deux longueurs d'onde 340 nm et 380 nm et l'émission de la fluorescence est mesurée à 510 nm.

A. MESURE DE L'INFLUX DU CALCIUM

Pour induire un influx SOCE, les cellules ont été traitées avec de la TG à 1 μ M, un inhibiteur irréversible sélectif des pompes Ca^{2+} ATPase du RE (SERCA) (Thastrup O, 1990), ce qui provoque un épuisement des réserves calciques du RE et l'ouverture des canaux SOC (Putney, 1986).

Le traitement des cellules avec la TG est suivi d'une augmentation de la $[Ca^{2+}]_{cyt}$ suite à la libération du Ca^{2+} du RE vers le cytosol. Après 400 secondes, 2 mM de $CaCl_2$ sont ajoutés dans la suspension cellulaire pour induire une entrée massive des ions Ca^{2+} . Pour les expériences réalisées sur les cellules T Jurkat, nous avons utilisé 1 mM de $CaCl_2$ au lieu de 2 mM. Les changements des concentrations intracellulaires de Ca^{2+} sont mesurés et la différence de la $[Ca^{2+}]_{cyt}$ au pic de l'influx et $[Ca^{2+}]_{cyt}$ de base avant le rajout du calcium est calculée et exprimée en pourcentage d'influx (figure 16).

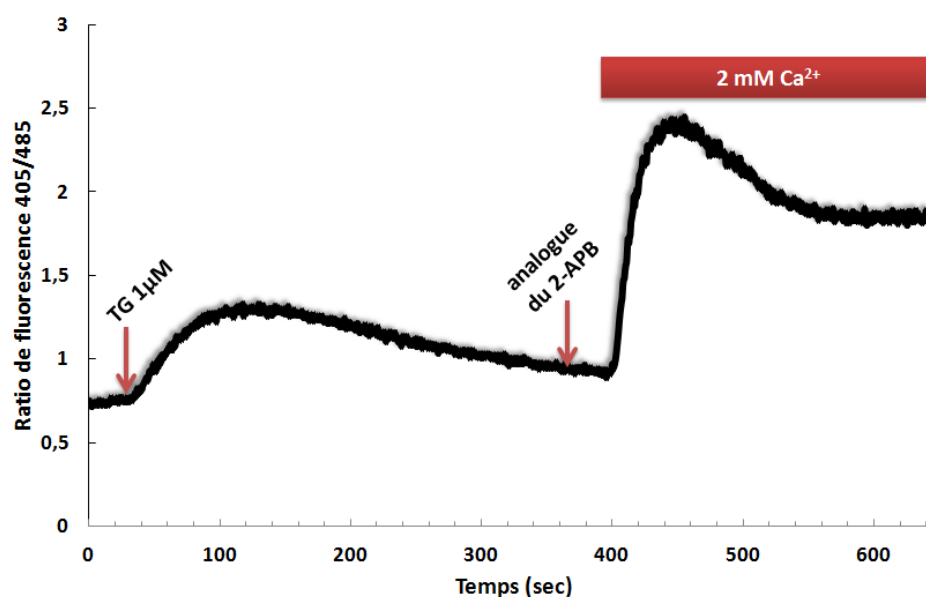


Figure 16. Protocole de mesure de l'influx calcique de type SOCE. Les cellules PLB-985 différenciées ont été traitées par la TG pour vider les réserves calciques du RE. Les canaux SOCs s'ouvrent et permettent un influx massif des ions Ca^{2+} . L'analogue de 2-APB a été ajouté 30 secondes avant l'ajout de 2 mM de $CaCl_2$.

B. ANALOGUES DU 2-APB ET INFLUX DE CALCIUM

Pour étudier l'effet des analogues du 2-APB sur l'influx calcique des cellules Jurkat et PLB-985 différenciées, ces molécules ont été ajoutées à la suspension cellulaire 30 secondes avant d'ajouter le CaCl₂ (**figure 16**).

1. PRODUITS CHIMIQUES

Les analogues du 2-APB, la thapsigargine et la ionomycine (Sigma-Aldrich, France) ont été dissous dans le DMSO (Sigma-Aldrich, France).

2. ANALOGUES DU 2-APB

On retrouve parmi les molécules utilisées dans cette étude les analogues du 2-aminoethoxydiphényl borate (**2-APB**), un produit largement utilisé pour la caractérisation de l'entrée capacitive de type SOCE (**Prakriya et Lewis, 2001, Iwasaki et al., 2001**).

D'un point de vue structural, la molécule du 2-APB peut être divisée en trois parties essentielles : un noyau contenant le groupe Bore-Oxygène-Carbone que nous avons désigné par le terme (BOC), deux noyaux phényles fixés sur l'atome de Bore et enfin une chaîne éthanolamine. La liste des composés utilisés comprend : le 2-aminoethoxydiphényl borate (**2-APB**) (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France). Le **Methoxy-APB**, elle contient un groupement méthoxy sur un des phényles, le **Dimethoxy-APB** avec deux groupements méthoxy fixés sur le même phényle, le **Cyclic-APB** dont les deux phényles sont liés par un pont (-CH₂-CH₂-), le **Benzothiényl-APB** où les deux phényles sont remplacés par deux groupements benzothiényles, le **Thienyl-APB** qui possède deux groupements thiényles à la place des deux phényles (Specs, Delft, Pays-Bas), et enfin le méthyle diéthyle borinate (**MDEB**) (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) avec deux groupements

éthyles à la place des phényles, sans chaîne alkylamine, la nomenclature des composés est représentée en **tableau 1** et leurs structures sont présentées en **figure 17**.

Tableau 1. Nomenclature chimique des analogues du 2-APB

| analogue | Nomenclature chimique |
|------------------|--|
| 2-APB | 2-((diphénylboranyl)ethan-1-amine |
| Methoxy-APB | 2-(((2-méthoxyphényl)(phényl)boranyl)oxy)ethan-1-amine |
| Diméthoxy-APB | 2-(((2,3-diméthoxyphényl)(phényl)boranyl)oxy)ethan-1-amine |
| Cyclic-APB | 2-((10,11-dihydro-5H-dibenzo[<i>b,f</i>]borepin-5-yl)oxy)ethan-1-amine |
| Thienyl-APB | 2-((di(thiophen-2-yl)boranyl)oxy)ethan-1-amine |
| Benzothiényl-APB | 2-((bis(benzo[<i>b</i>]thiophen-2-yl)boranyl)oxy)ethan-1-amine |
| MDEB | diéthyl(méthoxy)borane |

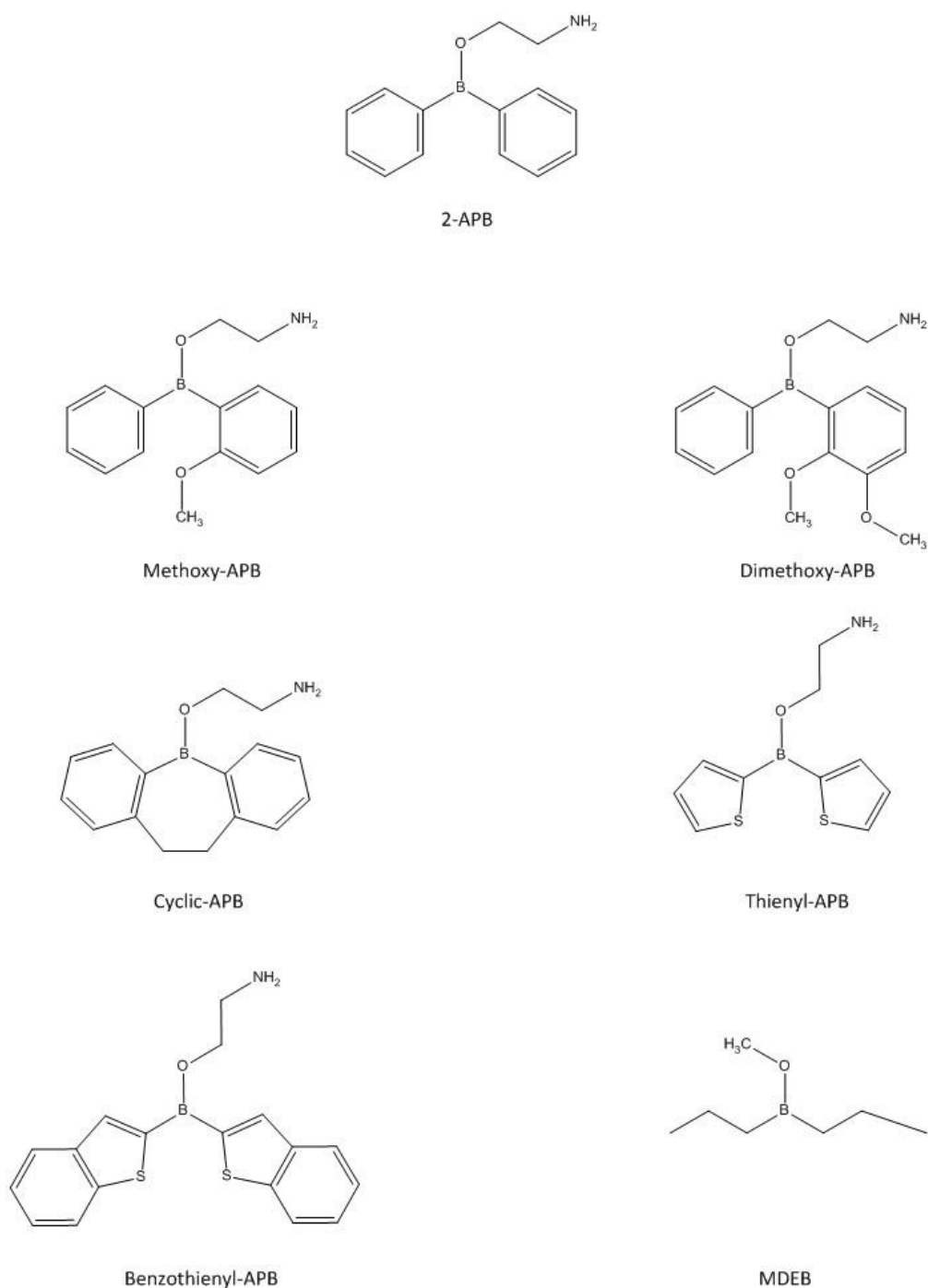


Figure 17. Structure du 2-APB et ses analogues. Les structures chimiques des composés ont été dessinées avec *ChemBioOffice 2012*[®])

C. LIBERATION DU CALCIUM A PARTIR DU RE

Le 2-APB a été initialement caractérisé comme un inhibiteur des InsP_3Rs (Maruyama *et al.*, 1997). Pour évaluer l'effet que peuvent avoir ces analogues du 2-APB sur les InsP_3Rs et par conséquent la libération du calcium à partir du RE vers le cytosol, les cellules Jurkat ont été stimulées en absence du Ca^{2+} extracellulaire avec la phytohémagglutinine (PHA) à $10 \mu\text{g/ml}$, un ligand du TCR qui permet l'activation de la PLC, la production de l' InsP_3 et par conséquent la libération du calcium dans le cytosol (Tsien *et al.*, 1982, Imboden et Stobo, 1985). Les cellules ont été au préalable incubées pendant 5 min avec l'analogue de 2-APB et ensuite stimulées avec la PHA $10 \mu\text{g/ml}$ (figure 18).

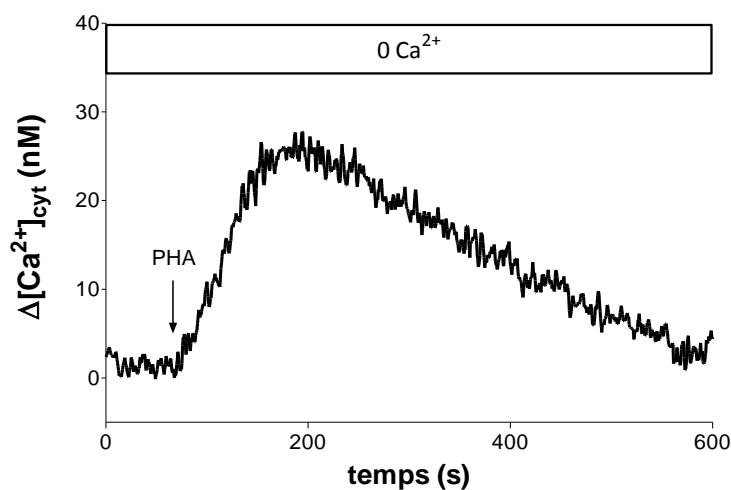


Figure 18. Protocole de mesure de la libération de Ca^{2+} à partir du RE. Les cellules Jurkat ou les cellules PLB-985 ont été pré-incubées avec les analogues du 2-APB pendant 5 minutes puis traitées avec la PHA $10 \mu\text{g/ml}$ en absence du Ca^{2+} extracellulaire.

Pour étudier la libération du calcium à partir du RE des cellules PLB-985 différenciées, la stimulation des cellules a été faite par le fMLF et WKYMVm qui se lie aux FPR et activent une cascade de signalisation conduisant à la production de

l'InsP₃ (Le *et al.*, 2000). La TG a également été utilisée pour induire la libération du Ca²⁺ à partir du RE.

VII. MESURE DE L'INFLUX DU BARYUM

Comme le Ca²⁺, le Baryum (Ba²⁺) est un cation divalent qui suit la même voie d'entrée que le Ca²⁺. En revanche, il est très faiblement extrudé par les pompes Ca²⁺-ATPase membranaires PMCA ou l'échangeur Na⁺-Ca²⁺ (*Na⁺-Ca²⁺ exchanger*, NCX). Ceci nous permettra de mesurer uniquement la voie d'entrée (influx). Afin d'étudier l'influx du Ba²⁺, nous avons suivi le même protocole décrit plus haut. Les cellules PLB-985 différenciées en présence de 1,25% de DMSO, ont été chargée avec la sonde fluorescente Indo-1 à la concentration de 4 μM pendant 45 min à l'abri de lumière. La sonde Indo-1 est excitée à 360 nm et les émissions de la fluorescence à 405 nm et 485 nm sont enregistrées. Ensuite, les concentrations intracellulaires en Baryum [Ba²⁺]_{cyt} ont été calculées selon l'équation de Grynkiewicz:

$$[Ba^{2+}]_{cyt} = K_D' \times \frac{F_{405max}}{F_{485min}} \times \frac{R - R_{min}}{R_{max} - R} \text{ (Grynkiewicz et al., 1985).}$$

K_{D'} est la constante de dissociation du complexe indo-1~Ba²⁺ = 780 nM à 37°C, R est le ratio F_{405}/F_{485} . R_{max} est le ratio de la fluorescence lorsque la sonde indo-1 est saturée par un excès de Baryum extracellulaire (10 mM de BaCl₂) en présence de la ionomycine 1μM. Le R_{min} est le ratio calculé en ajoutant dans la solution de l'EGTA à 10 mM et du triton 100X.

Le protocole consiste à stimuler les cellules en absence du Ca²⁺ extracellulaire avec le fMLF, WKYMVm ou la TG pour vider le RE de ses réserves calcique et provoquer ainsi l'ouverture des SOCs. Ensuite, le BaCl₂ à la concentration de 5 mM a été ajouté permettant une entrée massive du Ba²⁺.

VIII. MESURE DE L'INFLUX DU MANGANESE

Le manganèse (Mn^{2+}), un cation divalent, comme le Ba^{2+} a la particularité d'entrer dans la cellule par la même voie que le Ca^{2+} sans être éliminé par la cellule. Mais aussi la spécificité du Mn^{2+} est d'éteindre la fluorescence de Fura-2 quand on excite au point isobestique à 360 nm. L'émission de la fluorescence est mesurée à 510 nm.

Ceci nous a permis d'éliminer la partie efflux et ne mesurer que l'influx réel. Les cellules PLB-985 différenciées (10^6 de cellules/ml) ont été traitées par la TG, fMLF ou le WKYMVm pour vider le RE de ses réserves en Ca^{2+} , ensuite, 300 μM de $MnCl_2$ sont ajoutés pour induire l'influx de Manganèse qui correspond à l'abaissement de la fluorescence (effet *quenching*).

Pour permettre de quantifier l'influx du Mn^{2+} et comparer l'effet des analogues du 2-APB sous différents types de stimulations, nous avons calculé la pente de l'influx (sur une durée de 40 secondes).

IX. SYNTHÈSE D'INTERLEUKINE-2 (IL-2)

Les expériences de la mesure des effets des analogues du 2-APB sur la synthèse de l'IL-2 ont été réalisées par (*Bouchaïb Lamkhioued et Sophie Catherine Gangloff, faculté de pharmacie, Université de Reims Champagne-Ardenne*). Les cellules Jurkat (1×10^6 de cellules/ml) ont été incubées dans une plaque de 96 puits avec de la PHA 10 mg/ml avec ou en absence de 10 μM des analogues de 2-APB. Ensuite le surnageant est collecté et les quantités de l'IL-2 ont été quantifiées par une technique ELISA en utilisant le kit Quantikine Human IL-2 Immunoassay (R&D Systems Europe, Lille, France). Le principe consiste à recouvrir les puits par un 1^{er} anticorps monoclonal spécifique pour l'IL-2. Ensuite lorsque les cellules rajoutées aux puits sont stimulées par la PHA, les quantités d'IL-2 produites sont détectées par un 2^{ème} anticorps conjugué à une enzyme HRP qui catalyse la formation d'un produit final dont

l'absorbance est mesurée à 450 nm. Elle traduit la quantité de l'IL-2 produit par les cellules Jurkat.

X. TEST TUNNEL

Une des caractéristiques de l'apoptose est la fragmentation de l'ADN. Pour mettre en évidence une éventuelle mort cellulaire par apoptose, un test de fragmentation d'ADN ou test TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labeling*) a été réalisé par (Isabelle DOIGNON et Olivier DELLIS, Université Paris-sud).

XI. MESURE SIMULTANEE DE LA PHAGOCYTOSE ET LA PRODUCTION DES FRO A L'INTERIEUR DU PHAGOSOME

Le but de l'étude était de pouvoir mesurer simultanément la proportion de PLB-985 différenciées internalisant les levures *Saccharomyces cerevisiae* et les FRO produites à l'intérieur des phagosomes formés. Afin de réaliser ces expériences, les levures ont été doublement marquées par les sondes Alexa Fluor 405 et DCFH₂ pour suivre respectivement la phagocytose et la production des FRO.

A. PREPARATION DU DICHLOROFLOUESCEINE (DCFH₂)

Le 2', 7'-dichlorodihydrofluoresceine (DCFH₂) a été préparé à partir du 2', 7'-dichlorodihydrofluoresceine diacétate (DCFH₂-DA) (Sigma Aldrich, France) par une hydrolyse alcaline avec 10 mM NaOH (Chen *et al.*, 2010) comme le montre la **figure 19**. Le DCFH₂ a été préparé à la concentration finale de 100 µM dans un tampon Phosphate 50 mM.

B. MARQUAGE DES PARTICULES DE LEVURES

Le double marquage des levures *Saccharomyces cerevisiae* avec les sondes fluorescentes Alexa Fluor 405 et DCFH₂ a été réalisé en suivant les recommandations du fournisseur (Invitrogen, Molecular Probes). Les levures *Saccharomyces cerevisiae* ont été inactivées en les chauffant à 100°C pendant 1h, et stockées à 10⁹ levures/ml à -20°C.

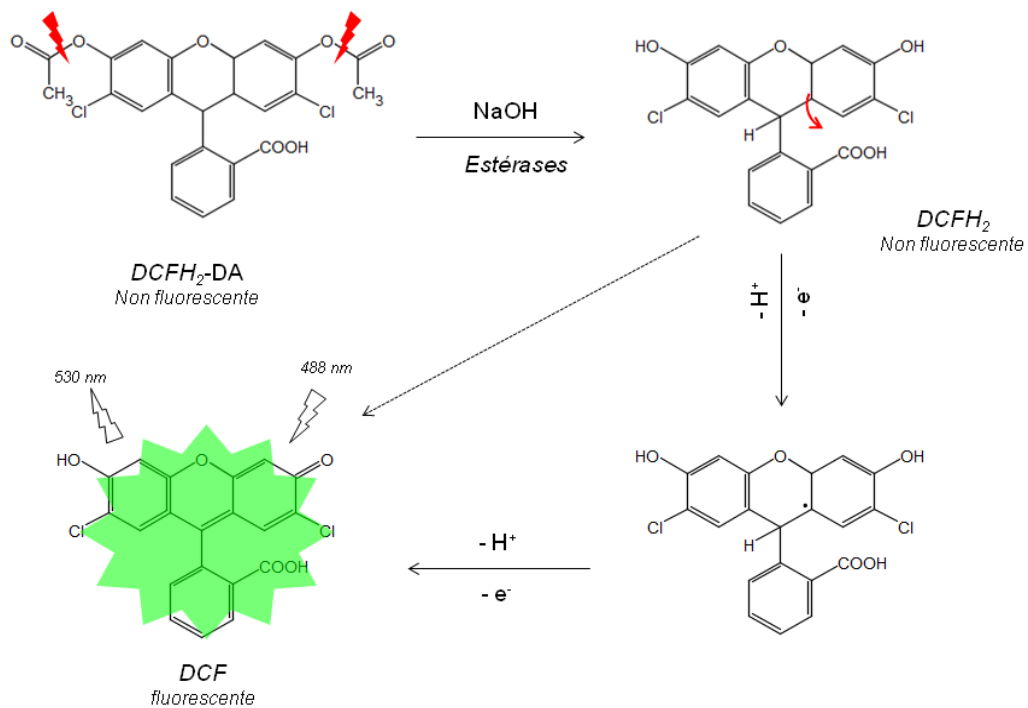


Figure 19. Préparation du DCFH₂ et son oxydation.

1. PREMIERE ETAPE : AJOUT DE LA SONDE ALEXA 405

Tout d'abord, les levures ont été marquées avec la sonde Alexa 405 (Alexa Fluor® succinimidyl ester) pour suivre leur phagocytose par les PLB-985 différenciées. Les levures sont resuspendues dans un tampon de bicarbonate de sodium 0.1 M, pH 8.3, préalablement dégazé par le nitrogène. Les levures sont lavées deux fois avec le tampon de bicarbonate de sodium, puis reprises dans 1 ml du tampon dégazé après centrifugation. L'Alexa 405 est préparée à la concentration de 10 mg/ml.

2. DEUXIEME ETAPE : AJOUT DE LA SONDE DCFH₂

Les levures ont été marquées ensuite avec le 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacétate succinimidyl ester (OxyBURST Green H₂DCFDA succinimidyl ester D-2935, Invitrogen) selon les recommandations du fournisseur. 5 x 10⁸ levures ont été mises en suspension dans 1,5 ml d'une solution de bicarbonate de sodium à 0,1 M (pH 8.3). Le réactif contenant la sonde (1,2 mg) a été dissous dans le DMSO immédiatement avant utilisation (10 mg/ml), puis rajouté à la suspension de levures. La réaction a été incubée pendant 2h à température ambiante. Pour permettre l'hydrolyse des groupements acétyl, 100µl de l'hydroxylamine à 1,5 M, pH 8,5 ont été ajoutés au mélange de la réaction et incubés pendant 1h à température ambiante. Pour enlever toute trace de sondes non fixées, les levures ont été lavées avec le tampon Phosphate dégazé. Le surnagent de levures a été oxydé avec du peroxyde d'hydrogène H₂O₂ et de la peroxydase (HRP) pour vérifier l'existence ou non de reste de sondes de DCFH₂ non fixées. Les complexes Levure-DCFH₂ ont été stockés à -20°C dans un tampon Phosphate à 50 mM, pH 7.4 à la concentration de 4. 10⁶ de cellules/ml.

C. OPSONISATION DES LEVURES

Les levures (*Saccharomyces cerevisiae*, Sigma-Aldrich) doublement marquées avec les sondes Alexa-405 et DCFH₂ ont été opsonisées en les mélangeant avec le même volume du sérum humain total (contenant les IgG et les molécules du complément). Le mélange est ensuite incubé pendant 1h à 37°C. Ensuite elles ont été lavées deux fois avec un tampon Hepes (sans sérum, sans glucose) en centrifugeant pendant 5 min à 671 g. Puis les levures sont resuspendues dans le même volume initial de tampon Hepes (sans sérum, sans glucose). Des aliquots de 50µl sont préparés et stockés à -80°C.

D. PREPARATION DES CELLULES PLB-985 DIFFERENCIEES

Les cellules PLB-985 différenciées avec du DMSO 1,25% sont comptées dans une cellule de Neubauer. Centrifugées à 377 g pendant 5 min puis reprises dans un tampon HBS contenant en mM : 1.2 CaCl₂, 135 NaCl, 5.9 KCl, 1.2 MgCl₂, 11.6 Hepes, 11.5 glucose, pH 7.3 (pH ajusté avec une solution de NaOH 1 M). Les cellules PLB-985 ont été ensuite mélangées avec les levures, un rapport de 1 phagocyte : 5 levures a été utilisé pour favoriser la phagocytose (**Figure 20**).

E. PREPARATION DES LEVURES

Après opsonisation avec le sérum humain complet, les levures sont lavées deux fois avec le tampon HBS. Dans des tubes Eppendorf , le mélange cellules PLB-985 différenciées / levure (1 : 5) est centrifugé à 13°C pendant 5 min pour mettre les cellules PLB et les levures en contact (**Grondahl et al., 2001, Quinn et al., 2007**). A ce moment là les analogues du 2-APB testés ont été rajoutés aux mélanges correspondants. Ensuite les tubes sont incubés pendant 45 min à 37°C pour permettre la phagocytose des levures opsonisées. Le processus de phagocytose est arrêté en mettant les tubes dans la glace.

F. CYTOMETRIE EN FLUX

Le contenu des tubes est repris dans des tubes en polystyrène (Starstedt, Allemagne) et dilué dans un tampon PBS. Ensuite, les tubes sont passés au cytomètre en flux (Partec, Allemagne) piloté par un logiciel FloMax (Partec Software, Allemagne).

Chaque particule est excitée par deux types de laser, un à 405 nm (laser violet) pour Alexa-405, pour une émission enregistrée à 455/20 nm (violet). Ce qui permet de détecter une fluorescence des levures suite à leur internalisation par les phagocytes.

Un deuxième laser qui excite à 488 nm (laser bleu) et permet de recueillir une émission à 536/40 nm (vert) suite à l'oxydation de la sonde DCFH₂ par les FRO

généérées au sein des phagosomes. Le pourcentage des cellules PLB-985 qui ont phagocyté a été quantifié ainsi que le pourcentage des cellules productrices de FRO (**Figure 20**).

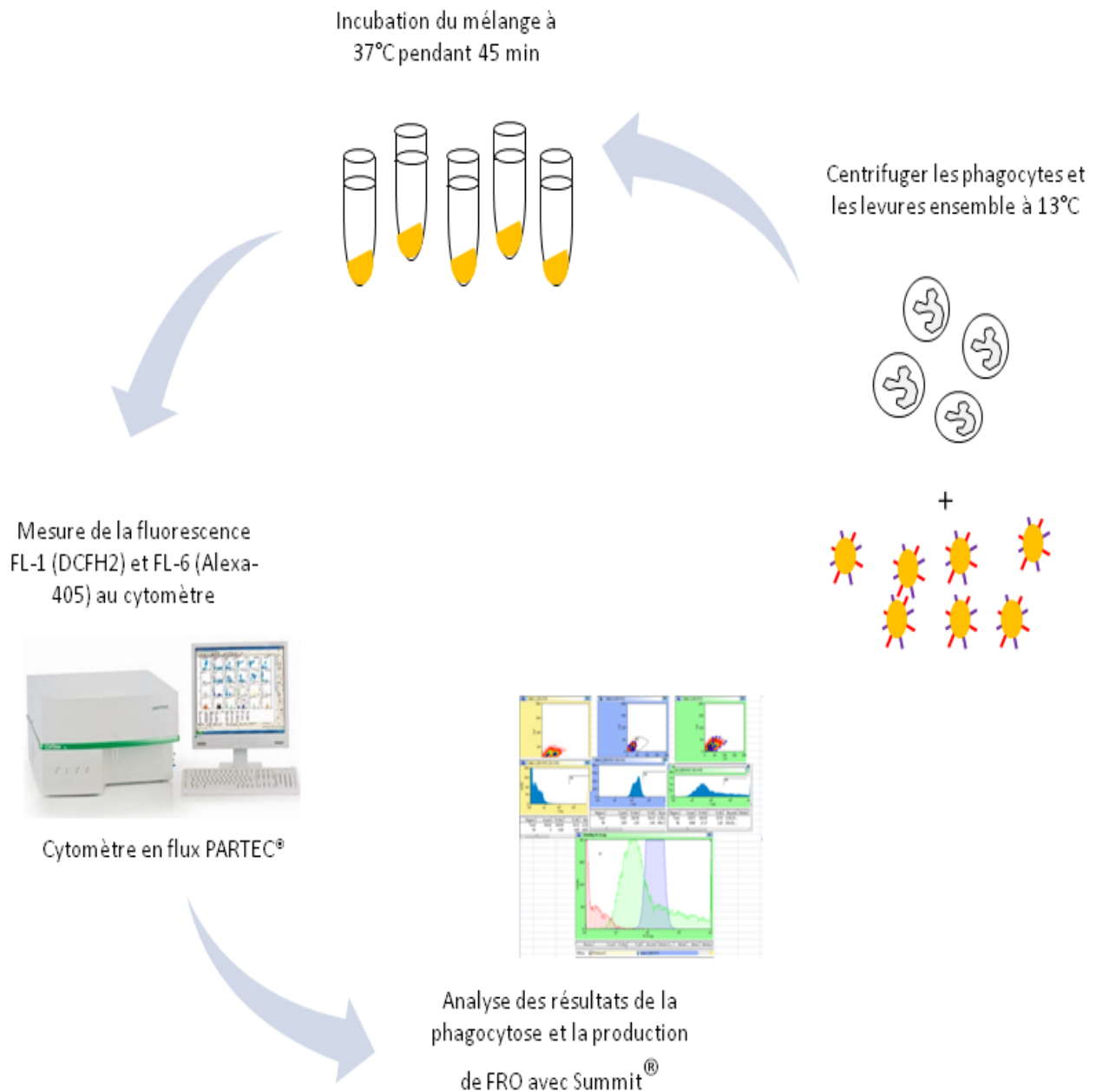


Figure 20. Etapes pour mesurer la phagocytose et la production des FRO. Les cellules PLB-985 différenciées sont mélangées à froid aux levures *S. cerevisiae* avec un rapport 1 phagocyte : 5 levures. Ensuite le mélange est incubé à 37°C pendant 45 min. La fluorescence émise par l'excitation des sondes Alexa 405 et DCFH₂ fixées sur les levures phagocytées est ensuite acquise grâce au cytomètre Partec® et les datas sont analysées avec le logiciel Summit®

1. Intensité et pourcentage de phagocytose

L'analyse des résultats de cytométrie en flux a été réalisée grâce au logiciel Summit, Beckman Coulter Inc, CA92834, Etats-Unis). La **figure 21** montre l'enregistrement au cytomètre du tube contenant les cellules PLB-985 différenciées en présence de levures doublement marquées avec les sondes Alexa-405 et DCFH₂. Après avoir sélectionné la population de cellules phagocytes, on mesure l'intensité de la fluorescence (émission Alexa-405) qui est passé dans le phagocyte, correspondant aux cellules qui ont phagocyté les levures.

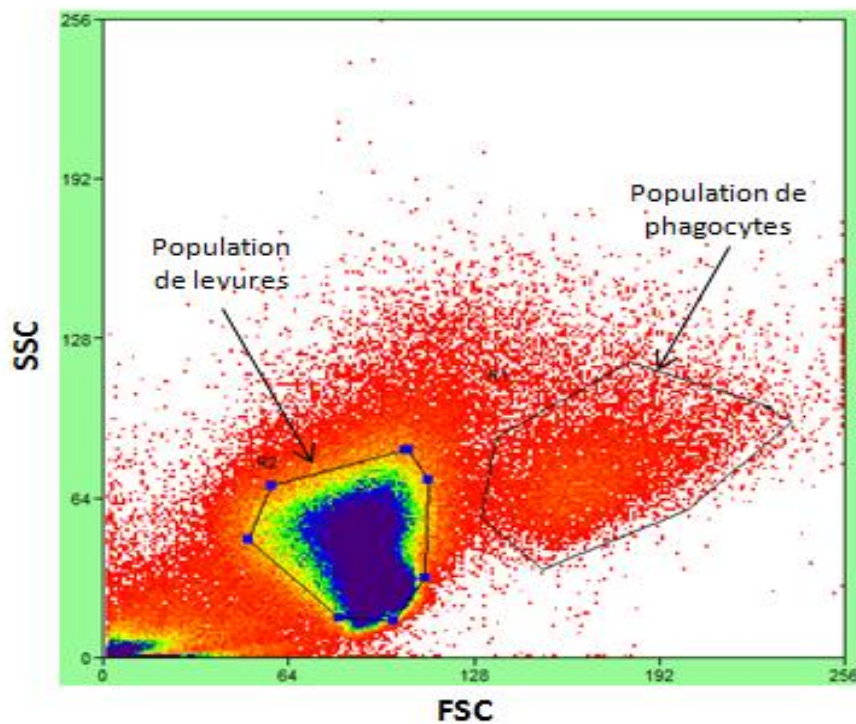


Figure 21. Séparation des deux populations de levures et de cellules PLB-985 différenciées. Acquisition des évènements correspondant aux cellules selon les deux axes en abscisse : FSC Forward Scatter et en ordonnées SSC: Side Scatter

La **figure 22** représente trois enregistrements correspondant aux cellules PLB-985 différenciées seules, levures seules doublement marquées avec Alexa-405 et DCFH₂ et des cellules PLB-985 différenciées en présence de levures doublement marquées avec Alexa-405 et DCFH₂. En bas l'intensité de la fluorescence d'émission de Alexa Fluor 405 dans les trois cas. Dans les cellules PLB-985 différenciées on n'observe pas de fluorescence. De même pour le tube contenant les levures seules. En revanche, dans les cellules PLB-985 différenciées qui ont été incubées avec les levures on constate une augmentation de la fluorescence correspondant aux phagocytes qui ont internalisé les levures marquées avec le DCFH₂ et Alexa Fluor 405. Le pourcentage des cellules PLB-985 différenciées qui ont phagocyté les levures a été calculé par rapport au nombre de PLB-985 total en mesurant le nombre de cellules qui présentent une fluorescence au delà du seuil de la fluorescence de base.

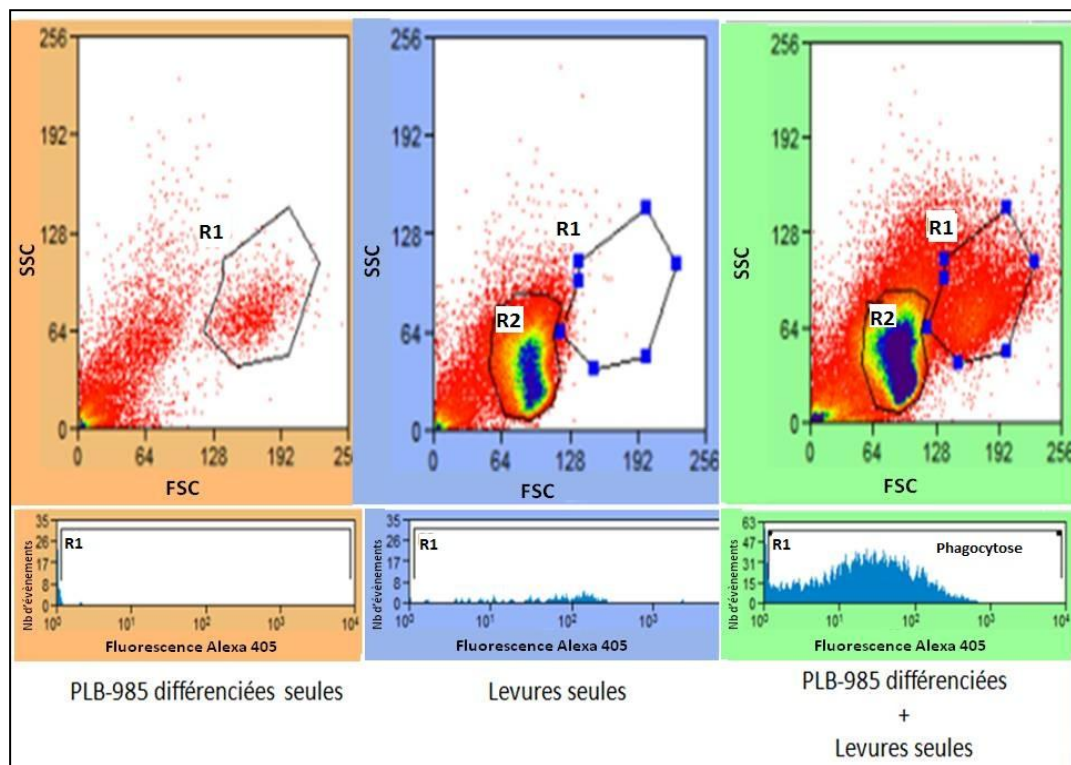


Figure 22. Mesure de l'intensité de la fluorescence (Alexa Fluor 405). Dans les tubes contenant les cellules PLB-985 différenciées seules et levures seules la fluorescence émise par la sonde Alexa Fluor 405 est nulle. En revanche, dans le tube qui contient les PLB-985 différenciées + les levures, on enregistre une fluorescence dans les cellules PLB-985 suite à la phagocytose des levures contenant Alexa Fluor 405. R1 et R2 sont les régions correspondant aux populations des PLB-985 et levures respectivement.

2. INTENSITE ET POURCENTAGE DE FRO PRODUITES

Le même protocole est suivi pour mesurer le pourcentage des cellules qui produisent des FRO intraphagosomales. Comme les levures possèdent une auto-fluorescence due à une oxydation partielle de la sonde DCFH₂, alors pour mesurer la production des FRO nous avons pris en compte uniquement la fluorescence produite au-delà du seuil de l'auto-fluorescence des levures. Enfin, le pourcentage des cellules PLB-985 différenciées qui ont produit des FRO détectables par la sonde DCFH₂ a été calculé et exprimé par rapport au nombre total de cellules.

Pour avoir une idée sur la production extracellulaire et intracellulaire des FRO non mesurable par la technique de cytométrie, nous avons utilisé la chimiluminescence au luminol.

XII. MESURE DE LA PRODUCTION DE FRO INTRA ET EXTRACELLULAIRES

A. CHIMILUMINESCENCE DU LUMINOL

La particularité du luminol est d'interagir avec les FRO en produisant un dérivé donnant de la lumière détectable au luminomètre. Pour étudier l'effet des analogues de 2-APB sur la production de FRO intra et extracellulaires, nous avons procédé à une mesure de la production de lumière (Chimiluminescence) grâce au lecteur de plaque (Perkin Elmer Wallac 1420 VICTOR3, Etats-Unis) piloté par le logiciel Wallac 1420 Workstation software.

Le principe de la mesure des FRO au luminol est que lors de la stimulation par un peptide chimiotactique (fMLF par exemple) des PLB-985 différenciées, les FRO ainsi produites interagissent avec le luminol, une réaction catalysée par une peroxydase de Raifort (HRP), il en résulte un produit intermédiaire (3-aminophtalate) à l'état excité, son retour à l'état non excité génère de l'énergie sous forme de lumière (**figure 23**).

Le protocole suivi consistait à comparer l'intensité de la chimiluminescence du luminol suite aux différents traitements des PLB-985 différenciées avec les analogues du 2-APB, dans les deux conditions en présence ou en absence du Ca^{2+} .

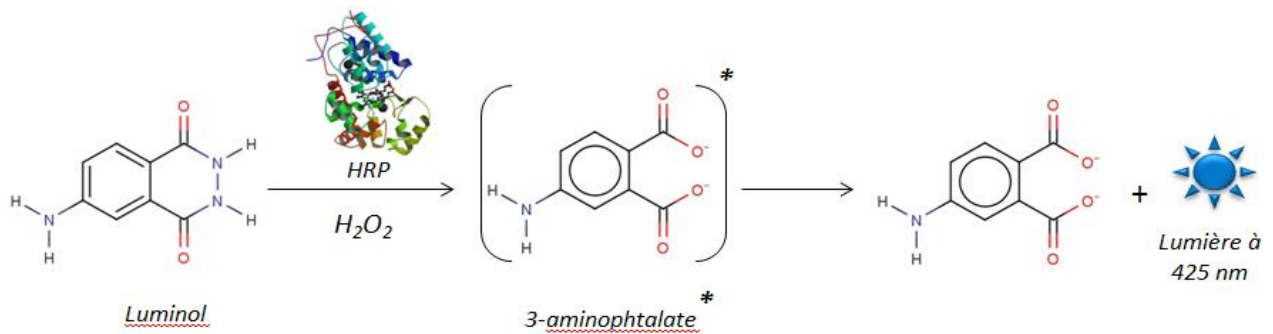


Figure 23. Principe de la chimiluminescence avec le luminol. Les peroxydes produits par les PLB-985 différenciées interagissent avec le luminol, une réaction catalysée par la HRP. Cette réaction génère un produit à l'état excité : le 3-aminophthalate*. Son retour à l'état non excité libère de l'énergie sous forme de lumière détectable au spectrophotomètre.

B. FLUORESCENCE DE L'AMPLEX-ULTRA RED

L'Amplex® UltraRed (Invitrogen, France), un autre outil de détection des FRO produites à l'extérieur des cellules. Les cellules sont déposées dans une plaque en propylène de 96 puits (Nunc, Roskilde, Danemark), incubées avec de la HRP et de l'Amplex UltraRed. Ce dernier interagit avec les peroxydes produits par les cellules PLB-985 différenciées et forme un composé appelé la résorufine. La résorufine est excitée à 590 nm, elle émet une fluorescence à 620 nm correspondant à la quantité de H_2O_2 produits (**figure 24**). L'intensité de la fluorescence émise est ensuite comparée après différentes stimulations par les peptides bactériens chimiotactiques et en présence ou non d'analogues de 2-APB.

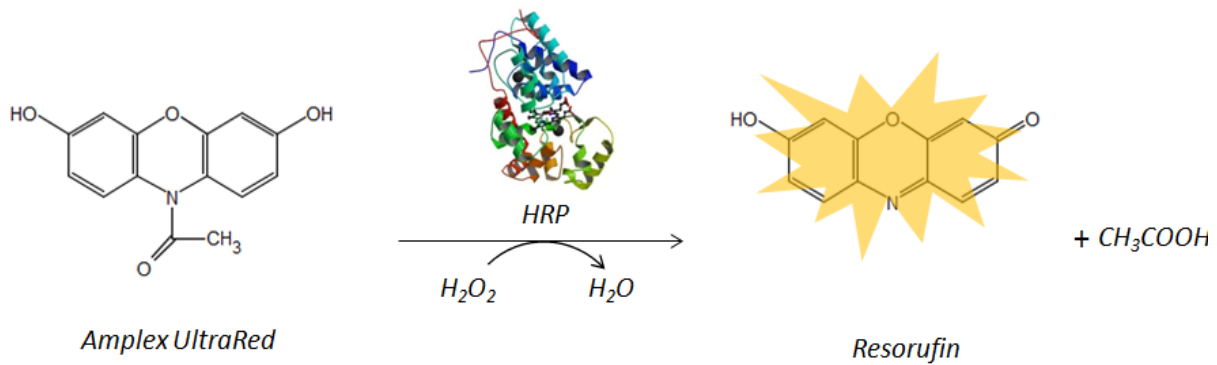


Figure 24. Principe de mesure des peroxydes avec l'Amplex UltraRed. L'Amplex UltraRed interagit avec le peroxyde en présence de la HRP pour former la résorufine, ce produit fluoresce lorsqu'il est excité à 590 nm.

XIII. PATCH CLAMP

Pour réaliser les expériences de patch-clamp, les cellules ont été fixées au fond des boîtes de Pétri grâce à la poly-ornithine pendant 10 min. Ensuite, les cellules sont lavées deux fois avec une solution extracellulaire de patch contenant en mM : 160 NaCl, 4.5 KCl, 1.2 MgCl₂, 5 Hepes et 10 CaCl₂, le pH a été ajusté à 7.4 avec une solution de NaOH. Les pipettes utilisées dans les expériences de patch sont obtenues à partir d'un capillaire de verre borosilicate (GC150F, Clark Electromedical Instruments, Angleterre). Elles ont été étirées avec une étireuse P-97 (Sutter Instruments, CA 94949, Etats-Unis). La solution intra-pipette contient en mM : 140 Césium-Aspartate, 2 MgCl₂, 10 BAPTA ou EGTA, 10 Hepes, le pH de la solution a été ajusté à 7.2 avec une solution de CsOH. Pour induire le SOCE et l'ouverture des SOC, les réserves en Ca²⁺ ont été vidées de manière passive par un des chélateurs de Ca²⁺ (EGTA ou BAPTA) présent dans la solution intra-pipette.

La résistance des pipettes varient entre 10-15 MΩ. Le courant CRAC (I_{CRAC}) a été enregistré en configuration cellule entière grâce à l'amplificateur Heka EPC9 (Heka Elektroniks, Lambrecht, Allemagne) piloté par un logiciel PATCHMASTER (Heka Elektroniks). Les courants ont été échantillonnés à 5 kHz et filtrés à 2.9 kHz. Lorsque

la configuration cellule entière est atteinte, le potentiel de maintien a été fixé à zéro pour minimiser l'influx de Ca^{2+} . La capacitance des cellules Jurkat varient entre $6,6 \pm 0,3$ pF et celle des PLB-985 différenciées entre 4-5 pF. I_{CRAC} a été induit par application d'un potentiel de 0 à -100 mV durant 100 millisecondes avec une acquisition toute les 2 secondes. L'amplitude du courant a été mesurée et exprimée en : amplitude sur capacitance membranaire (pA/pF).

Les données ont été analysées grâce au logiciel Pulse/Pulsefit (Heka Electroniks, Lambrecht, Allemagne).

XIV. ETUDES STATISTIQUES

Les études statistiques ont été réalisées en utilisant le test Student. Une différence entre deux conditions est considérée comme significative lorsque $p < 0,05$.

Les données sont exprimées en (Moyenne \pm SEM) représentatives au minimum de trois expériences indépendantes.

RESULTATS

RESULTATS

A. CARACTERISATION DE NOUVELLES MOLECULES D'INFLUX SOCE

XV. EFFETS DES ANALOGUES DU 2-APB SUR L'INFLUX CALCIQUE DE TYPE SOCE

Afin de caractériser de nouvelles molécules susceptibles de constituer de nouveaux outils pharmacologiques pour la caractérisation de l'influx calcique chez les leucocytes, nous avons procédé à des expériences de spectrofluorimétrie pour étudier l'influx calcique dépendant de l'état des réserves en calcium. Comme décrit précédemment dans le protocole (*voir chapitre Matériel et Méthodes*), les cellules Jurkat ont été traitées avec la TG 1 μM , puis incubées avec les analogues du 2-APB juste 30 secondes avant l'ajout de 1 mM de Ca^{2+} .

A. LA DOUBLE ACTIVITE DU 2-APB SUR L'INFLUX SOCE DES JURKAT

Le traitement des cellules Jurkat avec de la TG à 1 μM induit la libération du calcium à partir du RE. Dix minutes après, lorsque le Ca^{2+} est ajouté à la concentration de 1 mM, un influx massif des ions Ca^{2+} survient. Les cellules Jurkat en suspension ont été traitées avec une gamme de concentrations de 2-APB (0,1- 100 μM). Les résultats présentés en **figure 25** montrent que le 2-APB à la concentration de 5 μM augmente l'influx SOCE, tandis que le traitement des cellules avec des concentrations de 50 μM l'inhibait en comparaison avec des cellules contrôles non traitées.

Ceci nous a permis de réaliser une courbe dose-réponse (CDR) comme présenté en **figure 26** où on peut isoler deux composantes : une potentialisation de l'influx SOCE à faibles concentrations (1-10 μM) avec un pic de potentialisation à $(217,1 \pm 20 \%, n=3)$ à la concentration de 5 μM et une inhibition du SOCE des cellules Jurkat à partir des concentrations supérieures à 20 μM (Dellis *et al.*, 2011).

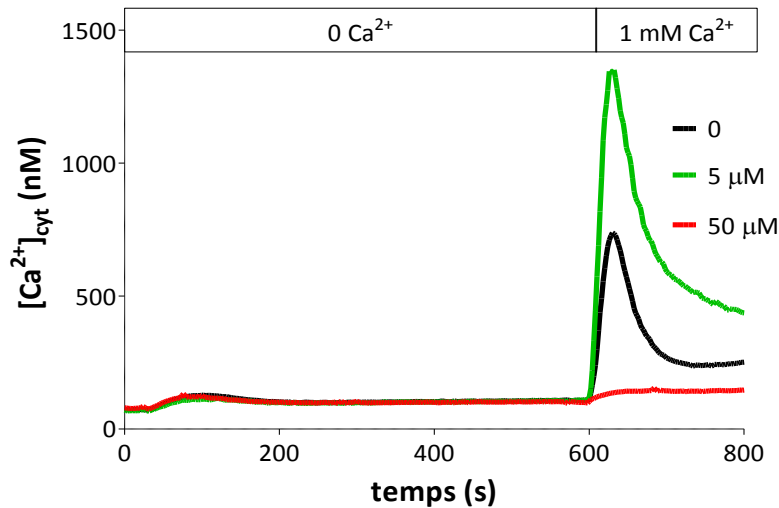


Figure 25. Effets de 2-APB sur l'influx calcique SOCE des cellules Jurkat. Les traces typiques montrent l'effet de potentialisation du 2-APB à 5 μM et l'inhibition du SOCE à 50 μM (Dellis *et al.*, 2011)

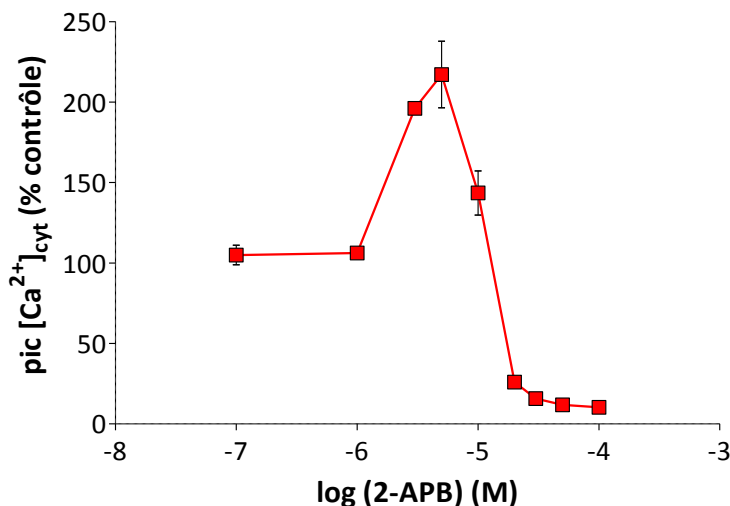


Figure 26. Courbe dose-réponse (CDR) de l'effet du 2-APB sur l'influx SOCE des cellules Jurkat. Les résultats représentent la moyenne de 3 expériences indépendantes (une expérience représente 9 concentrations différentes par jour).

B. LE METHOXY-APB ET LE DIMETHOXY-APB POTENTIALISENT MOINS L'INFLUX SOCE

Le Methoxy-APB et le Dimethoxy-APB sont des analogues structurellement très proches de la molécule du 2-APB qui comprend un noyau Bore-Oxygène-Carbone, deux phényles et une chaîne éthanolamine. Ces analogues possèdent en plus de ces trois composants majeurs un groupement (-OCH₃) pour le Methoxy-APB et deux groupement (-OCH₃) pour le Dimethoxy-APB fixés sur un seul phényle (*voir figure 17, Matériel et Méthodes*). Comme le 2-APB, les effets de ces deux analogues ont été étudiés sur l'influx SOCE des cellules Jurkat (**figure 27**). Après réalisation de la courbe dose-réponse, il s'est avéré que ces deux composés agissent de manière similaire à la molécule de référence (le 2-APB) en gardant la double activité sur l'influx SOCE mais on note une baisse de l'intensité de potentialisation à faibles concentrations (1-10 μM), le pic de potentialisation du Methoxy-APB et du Dimethoxy-APB à la concentration de 5 μM sont respectivement de (159,7 ± 8,3 %, n=3) et (126,9 ± 4,1 %, n=3). En revanche, ces deux molécules commencent à inhiber le SOCE à partir de 10 μM. Le profil d'inhibition est similaire à celui obtenu avec le 2-APB à partir des concentrations qui avoisinent les 20 μM (**figure 28**).

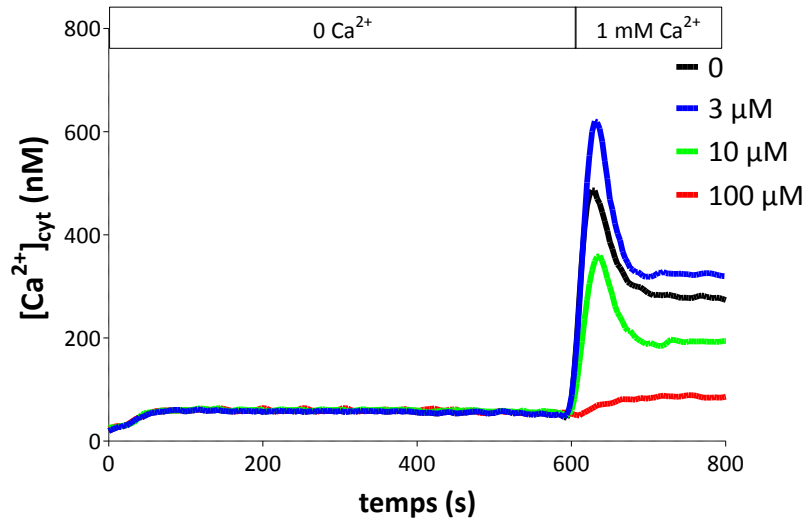


Figure 27. Effet du Dimethoxy-APB sur l'influx SOCE des cellules Jurkat. Des traces typiques de l'effet du Dimethoxy-APB sur le SOCE

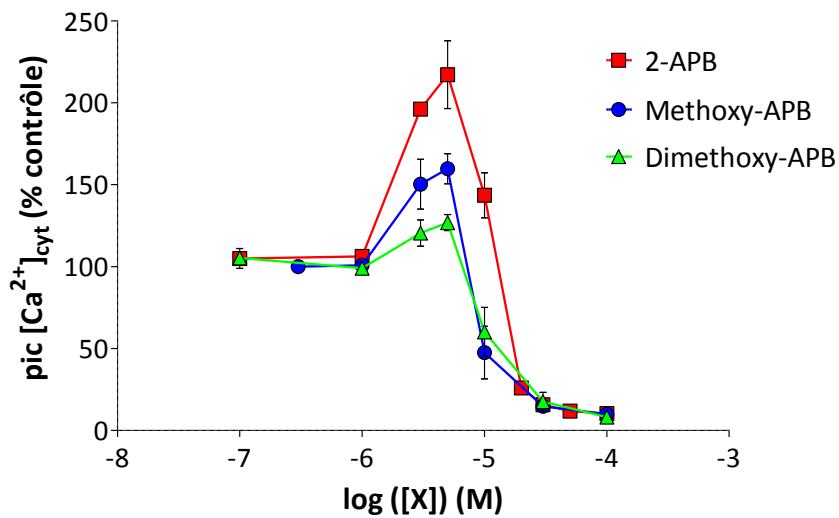


Figure 28. Courbe dose-réponse de l'effet du Methoxy-APB et du Dimethoxy-APB sur l'influx calcique SOCE des cellules Jurkat. Les résultats représentent les moyennes de 3 expériences indépendantes.

C. LE CYCLIC-APB NE POTENTIALISE PAS L'INFLUX SOCE

Le Cyclic-APB est un analogue du 2-APB dont les deux phényles sont reliés par un pont (-CH₂-CH₂-) (voir *figure 17, Matériel et Méthodes*). L'effet de ce composé a été étudié sur l'influx calcique de type SOCE des cellules Jurkat (*figure 29*), et une courbe dose-réponse de l'effet du Cyclic-APB a été réalisée et comparée à celle obtenue précédemment avec le 2-APB.

On constate que l'existence d'une liaison (-CH₂-CH₂-) entre les deux phényles créant ainsi un 3^{ème} cycle dans la molécule de cet analogue, supprime la potentialisation précédemment observée avec le 2-APB à faibles concentrations. Par ailleurs, l'inhibition de l'influx SOCE par le Cyclic-APB est plus puissante avec une constante d'inhibition IC₅₀ de l'ordre de 3 µM (n=4)(*figure 30*). Ceci pourrait être expliqué par un changement de conformation dans la molécule de 2-APB par la liaison qui empêche les deux cycles de se trouver dans une configuration favorable pour exercer un effet de potentialisation.

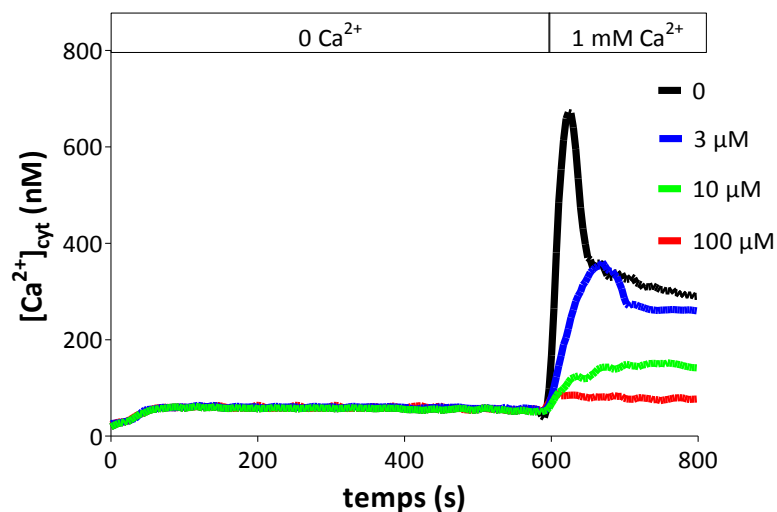


Figure 29. Effet du Cyclic-APB sur l'influx SOCE des cellules Jurkat

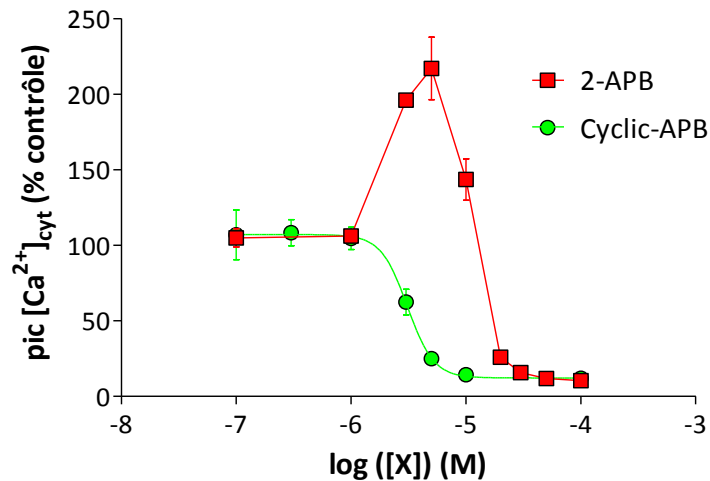


Figure 30. Courbe dose-réponse de l'effet du Cyclic-APB sur l'influx calcique SOCE des cellules Jurkat

D. LE BENZOTHIENYL-APB EST UN PUISSANT INHIBITEUR DU SOCE DES CELLULES JURKAT

Le Benzothienyl-APB se distingue de la molécule du 2-APB par deux groupements Benzothienyls qui remplacent les deux phényles (*voir figure 17, Matériel et Méthodes*). Les effets d'une gamme de concentrations de Benzothienyl-APB sur l'influx SOCE des Jurkat ont été étudiés en suivant le même protocole décrit plus haut (*figure 31*), et la courbe dose-réponse correspondante nous montre à la fois l'absence totale de la potentialisation du SOCE à faibles concentrations, mais aussi le puissant effet inhibiteur sur le SOCE des cellules Jurkat comparé à la molécule du 2-APB et au Cyclic-APB. A partir de la CDR nous avons pu calculer une constante d'inhibition IC_{50} qui est de l'ordre de $0,4 \mu M$ ($n=3$) (*figure 32*).

Une des hypothèses de l'absence de l'effet de potentialisation du Benzothienyl-APB sur le SOCE des Jurkat est la taille des deux groupements qui empêche sa liaison au site de potentialisation au niveau du canal SOCE et aussi la présence de l'atome de soufre qui pourrait jouer un rôle dans cette fixation.

Par ailleurs, la forte inhibition du SOCE observée pourrait être due aux groupements Benzothienyls qui forment une sorte de crochet de part et d'autre du pore du canal et par conséquent bloquent complètement ce pore.

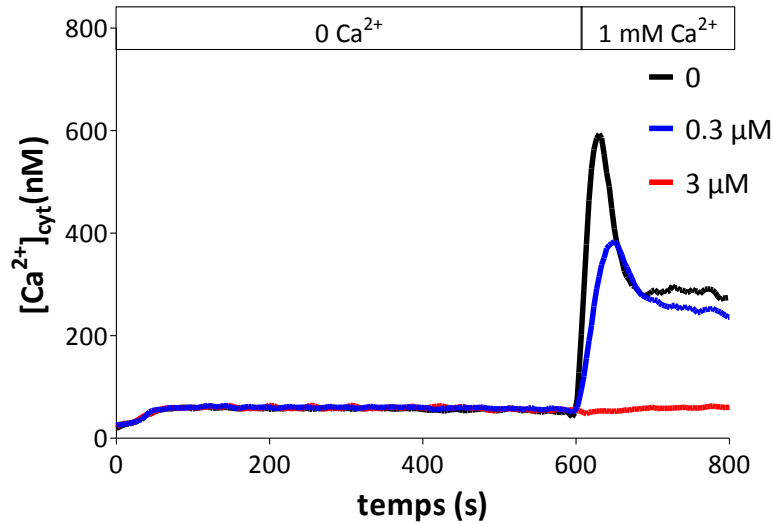


Figure 31. Effet du Benzothienyl-APB sur l'influx calcique SOCE des Jurkat

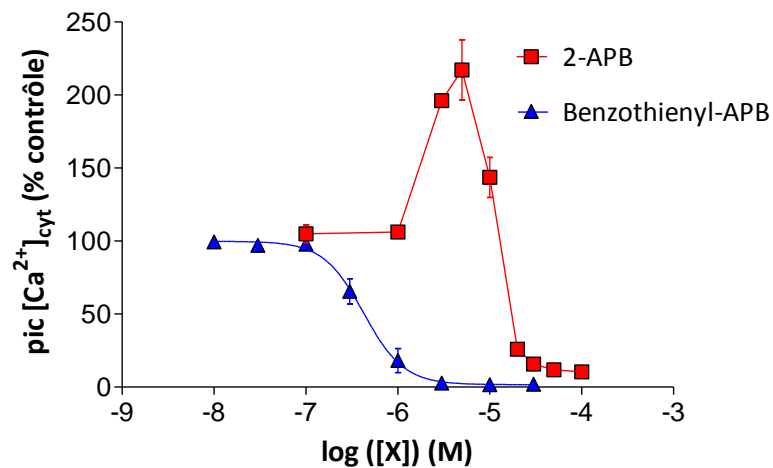


Figure 32. Courbe dose-réponse de l'effet du Benzothienyl-APB sur l'influx calcique de type SOCE des cellules Jurkat

E. LE THIENYL-APB AGIT COMME LE 2-APB MAIS AVEC UNE MOINDRE AFFINITE

Le Thienyl-APB est un composé qui possède deux groupements thienyls à la place des phényles (voir *figure 17, Matériel et Méthodes*). Nous avons suivi le même protocole pour étudier les effets de cet analogue sur l'influx de Ca^{2+} de type SOCE sur les cellules Jurkat (*figure 33*). Après analyse des résultats, une courbe dose-réponse correspondante a été tracée et représentée en *figure 34*.

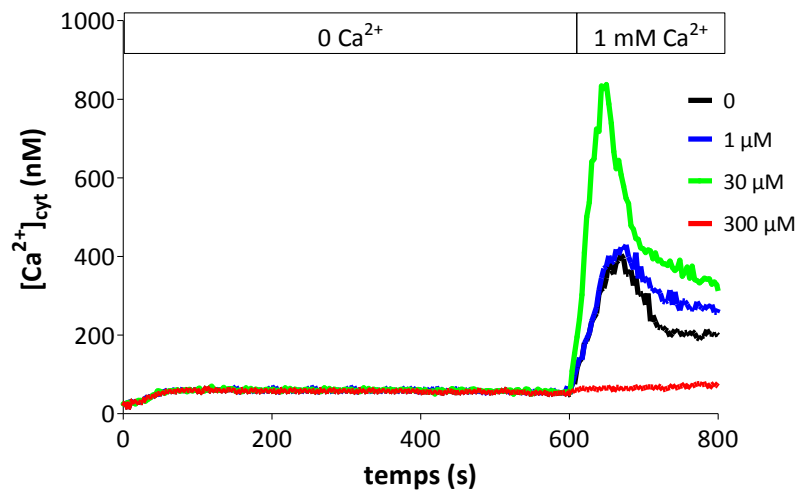


Figure 33. Effet du Thienyl-APB sur l'influx SOCE des cellules Jurkat

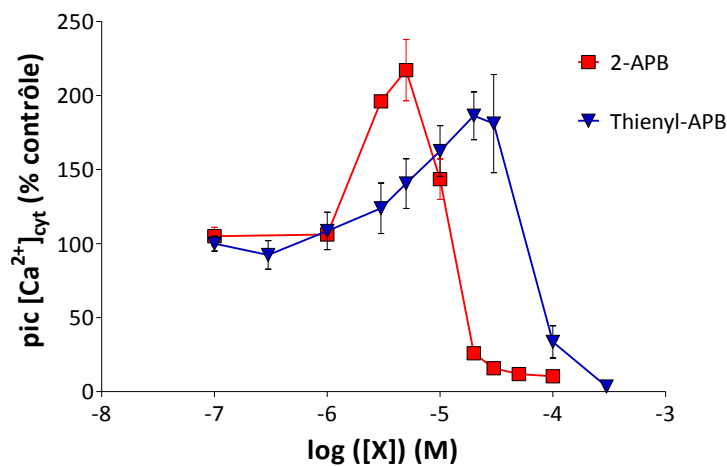


Figure 34. Courbe dose-réponse de l'effet du Thienyl-APB sur l'influx calcique SOCE des cellules Jurkat

Le Thienyl-APB possède une double activité sur le SOCE avec une potentialisation à la concentration de 30 μM , le pic atteint ($186,3 \pm 14,7\%$, $n=3$) tandis qu'une inhibition complète du SOCE n'intervient qu'à une très forte concentration de 300 μM . En comparant les deux CDR, le Thienyl-APB présente un shift de l'ordre de 10 par rapport au 2-APB. Structuellement, les groupements Thienyls sont très proches en taille aux phényles et ne peuvent pas être la cause de ce shift ; en revanche, l'atome de soufre présent pourrait affecter la sensibilité et l'affinité de la molécule à la fois au site de potentialisation et au site d'inhibition.

F. LE MDEB UN POTENTIALISANT PUISSANT DU SOCE

Dans la série des analogues étudiés on retrouve le MDEB, qui est un analogue du 2-APB qui ne possède pas de phényles, ces derniers sont remplacés par des éthyles, et la chaîne éthanolamine par un méthyle (*voir figure 17, Matériel et Méthodes*). Les effets de ce composé ont été étudiés sur l'influx SOCE des cellules Jurkat (**figure 35**). Une courbe dose-réponse est réalisée et comparée avec celle du 2-APB. Le MDEB potentialise le SOCE des Jurkat avec un pic à 1 mM ($243,13 \pm 20\%$, $n=3$). Par ailleurs, aucune inhibition n'est observée, ce que fait de ce composé un outil uniquement potentialisant du SOCE (**figure 36**). La potentialisation de cette molécule sur le SOCE peut s'expliquer par la présence du noyau BOC nécessaire à la potentialisation. Tandis que l'absence de phényles peut expliquer l'incapacité du MDEB à exercer une inhibition.

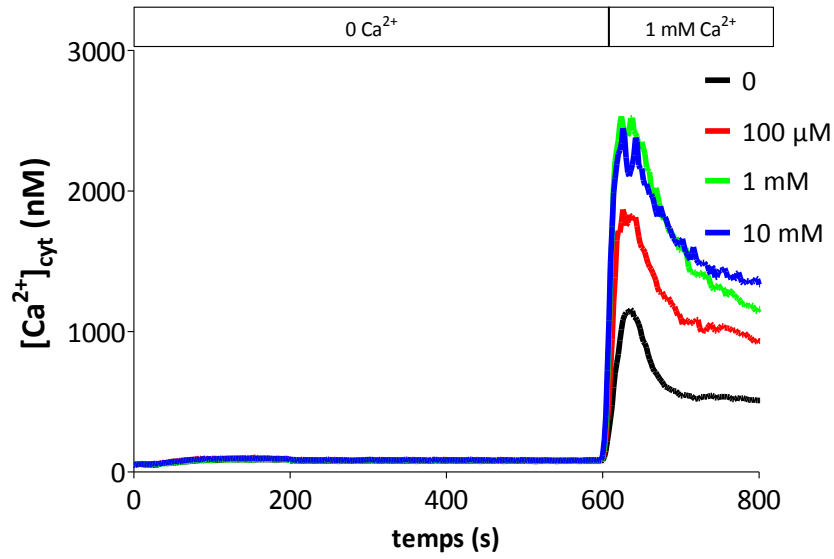


Figure 35. Effet du MDEB sur l'influx SOCE des cellules Jurkat

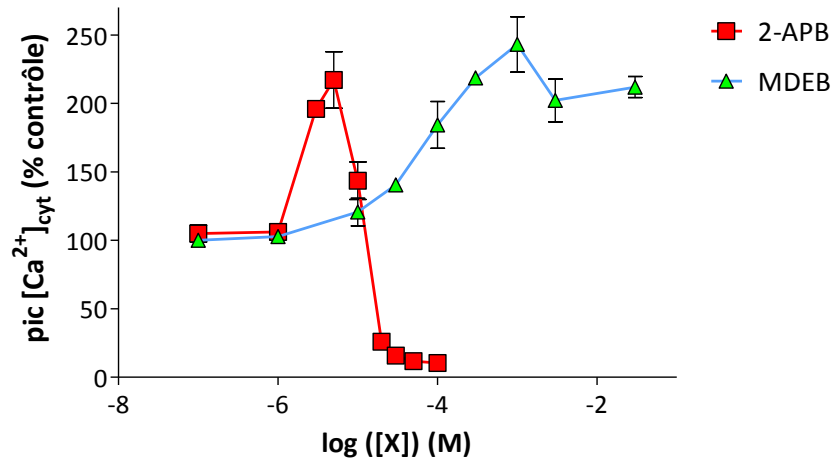


Figure 36. Courbe dose-réponse de l'effet du MDEB sur l'influx calcique SOCE des cellules Jurkat

XVI. EFFETS DES ANALOGUES DU 2-APB SUR LA LIBERATION DU CALCIUM A PARTIR DU RE PAR LES $\text{Ins}_3\text{P}_3\text{R}$

Initialement le 2-APB a été découvert comme un inhibiteur des InsP_3R (Maruyama *et al.*, 1997). Afin d'évaluer l'effet de ces analogues du 2-APB sur les InsP_3R et par conséquent la libération du calcium à partir du RE, les cellules Jurkat ont été pré-incubées pendant 5 minutes avec l'analogue à tester à des concentrations qui inhibent ou potentialisent le SOCE, puis elles ont été stimulées avec de la phytohémagglutinine 10 $\mu\text{g/ml}$ pour induire la libération du calcium à partir du RE (voir protocole *figure 18*, Matériel et Méthodes).

A. LE METHOXY-APB ET LE DIMETHOXY-APB INHIBENT LA LIBERATION DU CALCIUM A PARTIR DU RE

Le Methoxy-APB et le Dimethoxy-APB ont été utilisés à la concentration de 3 μM , qui permet une potentialisation de l'entrée SOCE dans les cellules Jurkat. Les cellules ont été d'abord pré-incubées pendant 5 min avec les analogues. Ensuite, elles ont été stimulées avec la PHA 10 $\mu\text{g/ml}$. Dans les cellules contrôles non pré-incubées avec les analogues, le pic de la libération de calcium atteint ($\Delta[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}} = 25,9 \pm 4,2 \text{ nM}$, $n=3$) après ($190,7 \pm 4,1$ secondes). On constate dans les cellules prétraitées avec 3 μM du Methoxy-APB ou Dimethoxy-APB, que la libération du calcium à partir du RE est inhibée pour atteindre ($\Delta[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}} = 2,3 \pm 1,2 \text{ nM}$, $n=10$), ($\Delta[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}} = 3,6 \pm 1,8 \text{ nM}$, $n=3$) respectivement par rapport aux cellules non traitées par les analogues (*figure 37*).

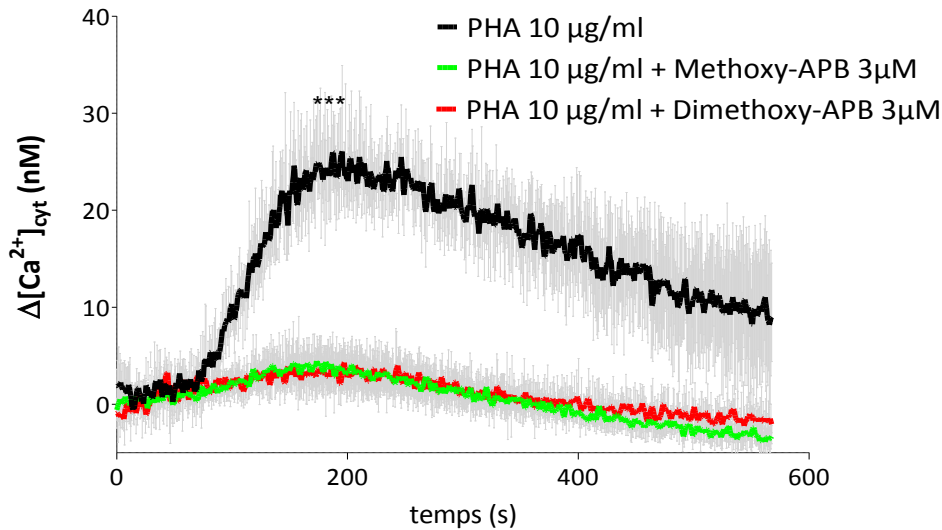


Figure 37. Le Methoxy-APB et le Dimethoxy-APB inhibent la libération du Ca^{2+} à partir du RE. Les moyennes et les SEM sont représentés dans la figure.

B. LE CYCLIC-APB ET LE BENZOTHIENYL-APB INHIBENT LA LIBERATION DU CALCIUM A PARTIR DU RE

Le Cyclic-APB et le Benzothienyl-APB utilisés à la concentration de 10 et 3 μ M respectivement, 10 μ M du Cyclic-APB permettent une inhibition de 80% de l'influx SOCE dans les cellules Jurkat. Alors que 3 μ M du Benzothienyl-APB inhibent complètement le SOCE dans ces cellules. Après une incubation des cellules avec les analogues (Cyclic-APB ou Benzothienyl-APB) pendant 5 minutes, elles ont été ensuite stimulées avec la PHA 10 μ g/ml. Dans les cellules contrôles, le pic de la libération de calcium atteint ($\Delta[Ca^{2+}]_{cyt} = 25,9 \pm 4,2$ nM, n=3) après ($190,7 \pm 4,1$ secondes). Les cellules prétraitées avec le Cyclic-APB à 10 μ M ou le Benzothienyl-APB à 3 μ M, la libération du calcium à partir du RE est inhibée pour atteindre ($\Delta[Ca^{2+}]_{cyt} = 5,3 \pm 1,8$ nM, n=6) et ($\Delta[Ca^{2+}]_{cyt} = 4 \pm 1,3$ nM, n=3) respectivement par rapport aux cellules contrôles (figure 38).

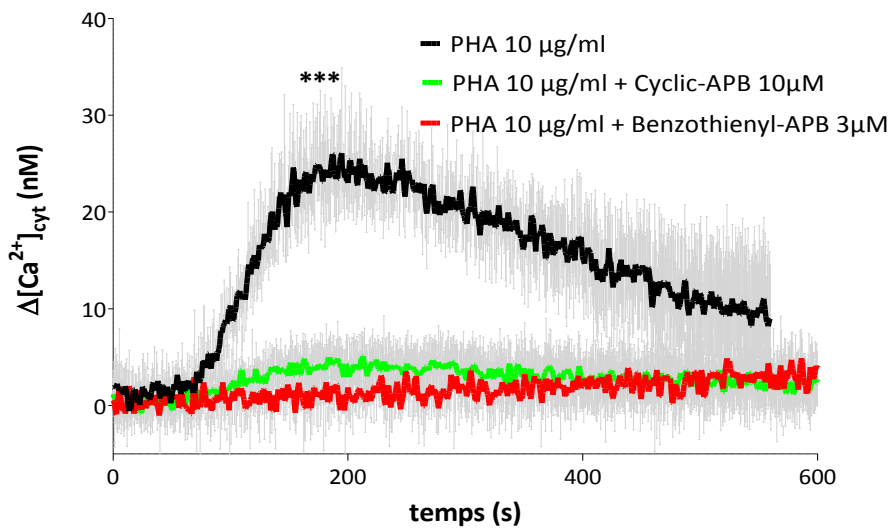


Figure 38. Le Cyclic-APB et le benzothienyl-APB inhibent la libération du Ca^{2+}

C. LE THIENYL-APB INHIBE LA LIBERATION DU Ca^{2+} A PARTIR DU RE

Le thienyl-APB a été utilisé à la concentration de $30 \mu M$ qui permet une potentialisation du SOCE des cellules Jurkat. Après une incubation des cellules Jurkat avec cet analogue pendant 5 min avec cet analogue et une stimulation avec la PHA $10 \mu g/ml$, on ne constate qu'une faible libération de Ca^{2+} dans le cytosol qui atteint ($\Delta[Ca^{2+}]_{cyt} = 4,3 \pm 1,7$ nM, $n=10$) après ($190,7 \pm 4,1$ secondes), par rapport aux cellules contrôle ($\Delta[Ca^{2+}]_{cyt} = 25,9 \pm 4,2$ nM, $n=3$) (figure 39).

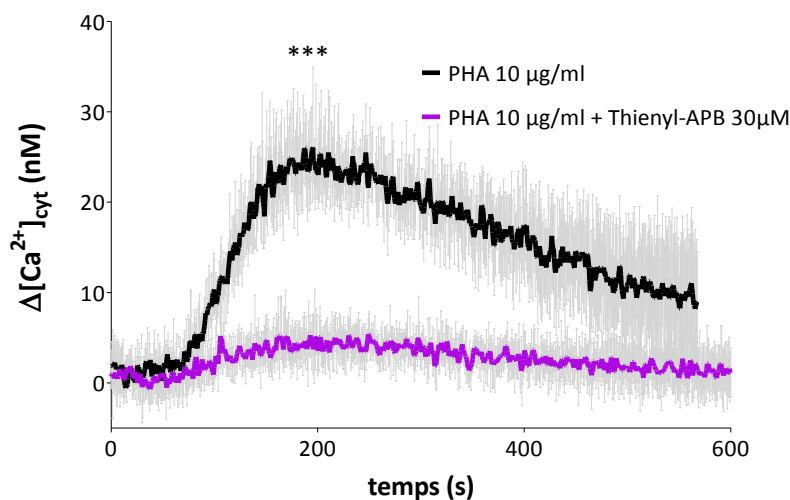


Figure 39. Le Thienyl-APB inhibe la libération du Ca^{2+}

D. LE MDEB N'AFECTE PAS LA LIBERATION DU CALCIUM A PARTIR DU RE

Les effets de 1 mM de MDEB sur les récepteurs IP₃R ont été étudiés sur les cellules Jurkat. Cette concentration permet de potentialiser l'entrée de Ca²⁺ de type SOCE. Pour cela, les cellules Jurkat ont été incubées pendant 5 min avec 1 mM du MDEB. Puis stimulées avec la PHA 10 µg/ml. Nous avons pu constater que le MDEB ne modifie pas la libération de Ca²⁺, le pic de la libération du Ca²⁺ est atteint à ($\Delta[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}} = 27,7 \pm 0,5 \text{ nM}$, n=2) après ($141,6 \pm 0,3 \text{ secondes}$, n=2), par rapport aux cellules contrôle ($\Delta[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}} = 25,9 \pm 4,2 \text{ nM}$, n=3) après ($190,7 \pm 4,1 \text{ secondes}$) (**figure 40**).

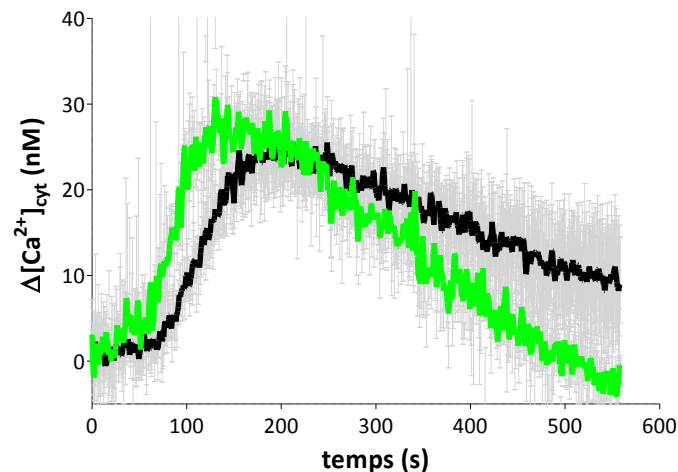


Figure 40. Le MDEB n'affecte pas les InsP₃Rs

Les pics de la libération de Ca²⁺ à partir du RE suite aux différents traitements des cellules par les analogues du 2-APB ont été comparées et représentés dans la **figure 41**.

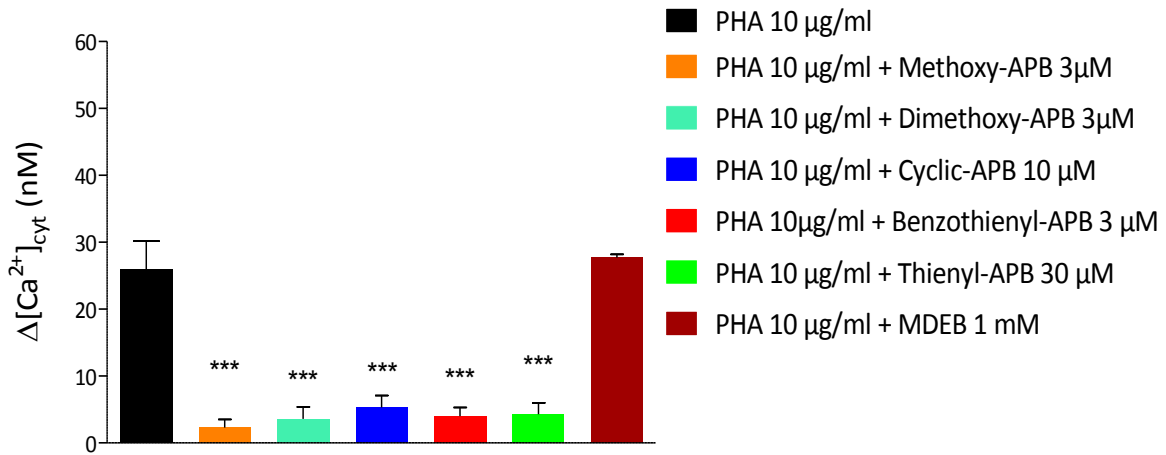


Figure 41. Parmi les analogues du 2-APB testés seul le MDEB n'a pas d'effet sur la libération du Ca²⁺ à partir du RE. Les étoiles montrent que un résultat significatif par rapport au contrôle PHA seul.

Après avoir testé l'effet des analogues du 2-APB sur l'influx SOCE et sur la libération du Ca²⁺ à partir du RE, nous avons décidé de continuer la caractérisation des molécules Cyclic-APB, le Benzothienyl-APB et le MDEB que nous avons considérées comme intéressantes. Les deux premières car elles sont uniquement inhibitrices de l'influx SOCE avec des IC₅₀ de 3 et 0,4 µM respectivement et le MDEB parce qu'il se présente comme la seule molécule uniquement potentialisatrice du SOCE qui existe sur le marché.

XVII. LE MDEB AUGMENTE L'AMPLITUDE DU IC_{RAC} DES CELLULES JURKAT

En configuration cellule-entière, la mesure du courant CRAC (*I*_{CRAC}) a été effectuée en présence de 10 mM de Ca²⁺ extracellulaire. *I*_{CRAC} a été activé par mobilisation passive des ions Ca²⁺ du RE avec le chélateur du Ca²⁺ BAPTA.

L'hyperpolarisation de la membrane des cellules Jurkat induit un faible courant entrant en absence de Ca²⁺ extracellulaire. Lorsque 1 mM de Ca²⁺ est ajouté,

l'amplitude du courant entrant augmente faiblement. I_{CRAC} est plus important en présence de 10 mM de Ca^{2+} extracellulaire (**figure 42.A**). En présence de 10 mM de Ca^{2+} extracellulaire et 1 mM de MDEB, l'amplitude du I_{CRAC} a augmenté rapidement de ~ 4 fois en présence de 1 mM de MDEB par rapport à l'amplitude du I_{CRAC} en présence de 10 mM de Ca^{2+} (contrôle). Puis il est inhibé par 1 μ M de Gadolinium. En revanche, dans ces cellules où la déplétion des réserves calciques a été réalisée par l'EGTA, l'amplitude du I_{CRAC} est uniquement doublée en présence de 1 mM de MDEB (**figure 42.B**). Les traces correspondantes à chacune des conditions (i, ii et iii) sont représentées en **figure 42.C**. Les traces du I_{CRAC} obtenues en présence et en absence de MDEB ont été superposées pour comparer la phase d'inactivation rapide due au Ca^{2+} (**figure 42.D**). On constate que le MDEB 1 mM exerce un effet inhibiteur sur la phase d'inactivation rapide, le calcul de pourcentage d'inactivation rapide du I_{CRAC} montre que le I_{CRAC} a été inactivé de $62 \pm 2\%$ en absence de MDEB mais l'inactivation ralentie avec le MDEB pour n'atteindre que $20 \pm 1\%$. Vers les potentiels très négatifs (-100 mV), le I_{CRAC} s'inactive en suivant deux phases à cause de la régulation par le Ca^{2+} , nous avons effectué une représentation bi-exponentielle des traces des courants obtenus et nous avons calculé les constantes d'inactivation rapide ($\tau_1 = 0,9 \pm 0,1$ ms) et lente ($\tau_2 = 20,8 \pm 0,9$ ms). Lorsque le MDEB 1 mM a été ajouté dans la solution extracellulaire, nous avons constaté en plus de l'augmentation de l'amplitude du I_{CRAC} , des changements au niveau des deux constantes rapide ($\tau_1 = 2,0 \pm 0,2$ ms) et lente ($\tau_2 = 40,1 \pm 7,7$ ms, $p < 0,01$).

Dans la solution interne de la pipette, lorsque le BAPTA a été remplacé par l'EGTA, un chélateur lent du calcium, la même potentialisation par le MDEB a été observée sauf que l'amplitude est plus faible (augmentée de 2 fois). Par ailleurs, le MDEB augmente les constantes d'inactivation rapide ($\tau_1 = 0,2$ ms) et lente ($\tau_2 = 39,6 \pm 5,1$ ms, $p < 0,01$) par rapport aux contrôles avec des constantes d'inactivation rapide ($\tau_1 = 0,1$ ms) et lente ($\tau_2 = 15,6 \pm 0,7$ ms, $p < 0,01$).

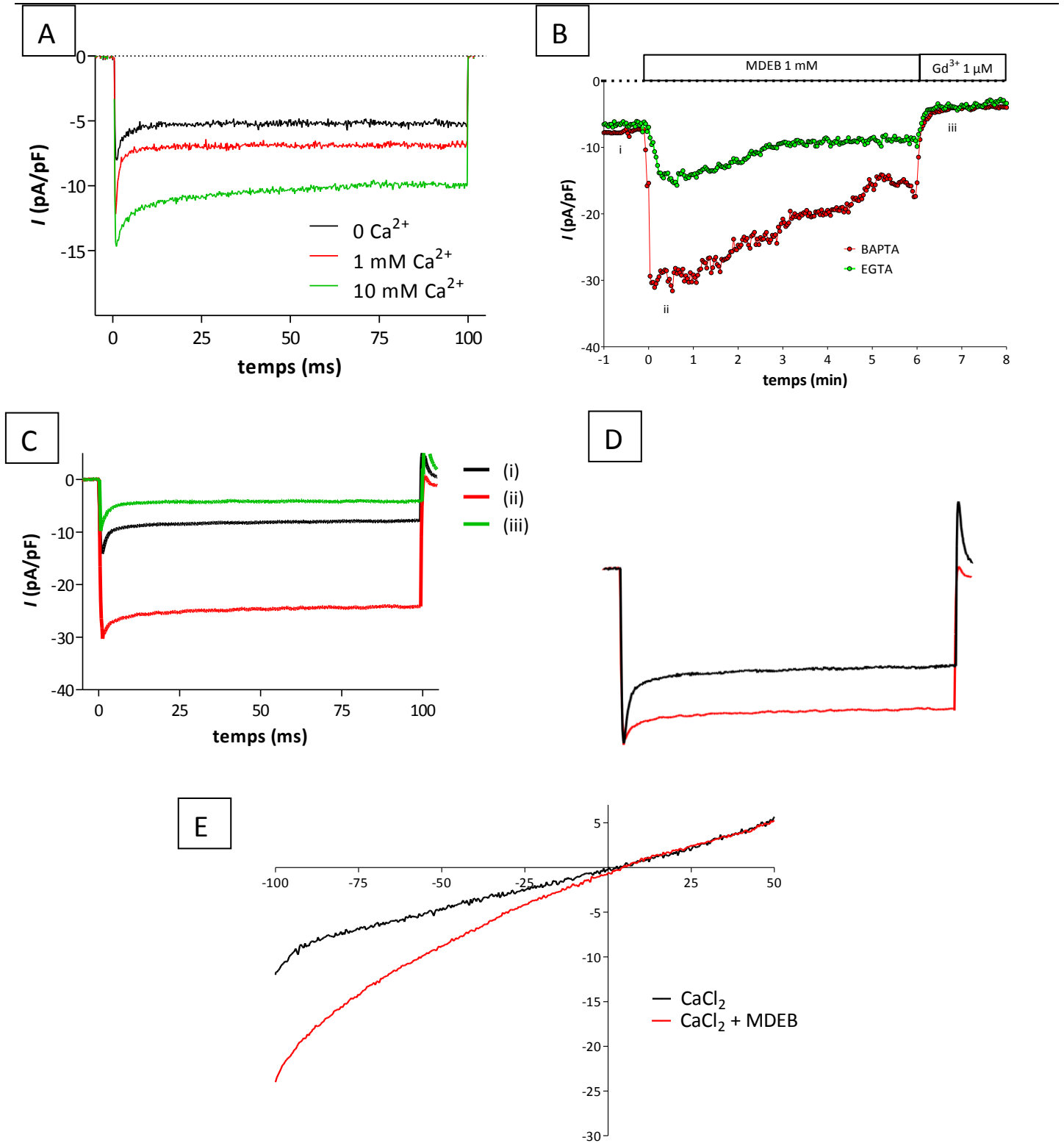


Figure 42. Effet du MDEB 1 mM sur le I_{CRAC} . **A)** I_{CRAC} induit par une mobilisation passive des ions Ca²⁺ contenus dans le RE. **B)** Potentialisation de I_{CRAC} par le MDEB suite à une déplétion passive du RE par l'EGTA (en vert) ou Le BAPTA (en rouge). I_{CRAC} est inhibé par 1 μM de GdCl₃. **C)** Les traces de courants correspondants aux phases : i (en présence de 10 mM de CaCl₂), ii (10 mM CaCl₂ + 1 mM MDEB) et iii (+ 1 μM GdCl₃) lors de la déplétion des réserves en Ca²⁺ avec le BAPTA 10 mM. **D)** Superposition des deux traces du I_{CRAC} en présence et en absence du MDEB. **E)** Courbes courant-potentiel (IV) de l'effet du MDEB sur I_{CRAC} .

XVIII. EFFETS DES ANALOGUES DU 2-APB SUR LA SYNTHÈSE DE L'INTERLEUKINE-2

Après avoir caractérisé l'effet de ces analogues du 2-APB sur l'influx SOCE, nous avons procédé à étudier les conséquences physiologiques de ces activités. Plus précisément sur un des marqueurs de la prolifération lymphocytaire T qui est la synthèse de l'interleukine-2 (IL-2). Donc nous avons quantifié la synthèse de l'IL-2 suite aux différents traitements des cellules Jurkat par les analogues du 2-APB.

A. LE CYCLIC-APB ET LE BENZOTHIENYL-APB INHIBENT LA SYNTHÈSE DE L'IL-2 DANS LES CELLULES JURKAT

Les cellules Jurkat qui n'ont pas été stimulées par la PHA ne produisaient plus d'IL-2, tandis que les cellules qui ont été stimulées avec la PHA 10 µg/ml et incubées pendant 24H synthétisaient de l'IL-2 (1064 ± 84 pg/ml, n=3). Les cellules qui ont été pré-incubées avec 10 µM du Cyclic-APB et stimulées avec la PHA à 10µg/ml ont synthétisé moins d'IL-2 (246 ± 10 pg/ml, n=3).

En revanche, on constate une très forte inhibition de la synthèse de l'IL-2 dans les cellules pré-incubées avec du Benzothienyl-APB et stimulées avec la PHA 10 µg/ml ($26,3 \pm 5,7$ pg/ml, n=3) (**figure 43**).

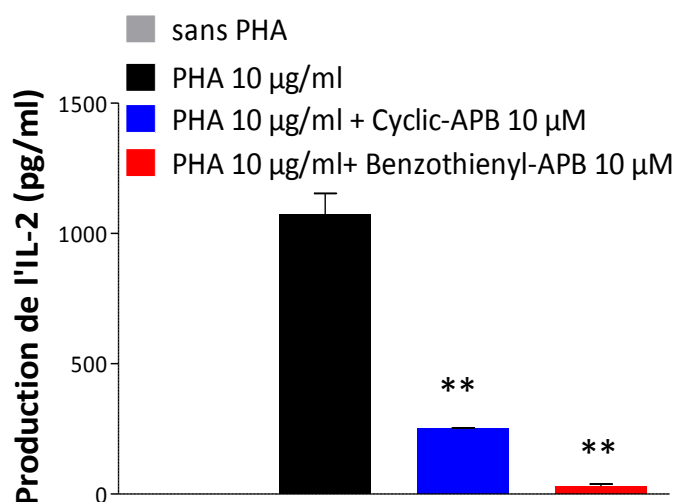


Figure 43. Effets des analogues du 2-APB sur la synthèse de l'IL-2. Les étoiles montrent que le résultat est significatif par rapport au contrôle PHA seul

B. LE MDEB INHIBE LA SYNTHÈSE DE L'IL-2 DANS LES CELLULES

JURKAT

Dans les cellules pré-incubées avec des concentrations croissantes de MDEB (1, 10, 100 et 1000 μM) et stimulées avec la PHA 10 $\mu\text{g/ml}$ pendant 24H, on constate une baisse dans la synthèse de l'IL-2. A la concentration de 1 mM la synthèse de l'IL-2 atteint ($81,38 \pm 2,32$ pg/ml, $n=3$) en comparaison avec les cellules contrôle uniquement stimulées avec la PHA ($159,7 \pm 3,3$ pg/ml, $n=3$) (**figure 44**).

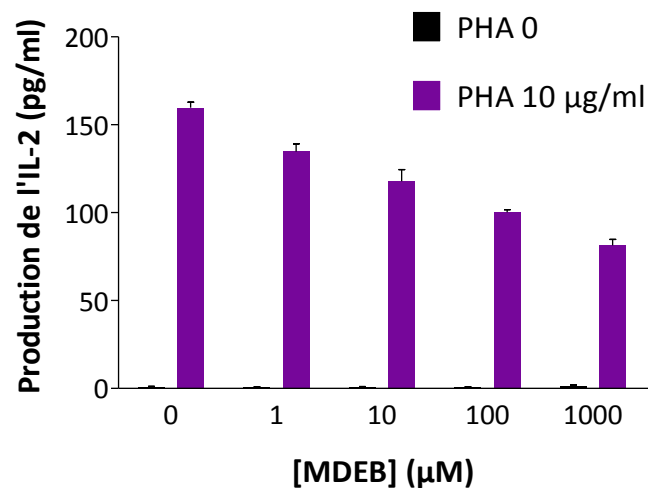


Figure 44. le MDEB à concentrations croissantes inhibe la synthèse de l'IL-2 dans les cellules Jurkat stimulées

L'inhibition de la synthèse de l'IL-2 avec 1 mM de MDEB malgré l'effet potentialisateur sur le SOCE et l'augmentation de l'amplitude de I_{CRAC} , pourraient suggérer une éventuelle toxicité cellulaire par surcharge en Ca^{2+} suite à une entrée massive de ce dernier. Pour étudier l'effet que peut avoir le composé MDEB sur un type de mort cellulaire qui est l'apoptose. Nous avons procédé à une étude d'apoptose par le test TUNEL.

XIX. MDEB INDUIT UNE APOPTOSE DES CELLULES STIMULEES PAR LA PHYTOHEMAGGLUTININE

Le marquage des cellules avec le DAPI (4',6'-diamidino-2-phénylindole) permet la visualisation des noyaux des cellules. Dans les conditions où les cellules Jurkat ont été incubées avec la PHA 10 µg/ml seule ou MDEB 1 mM seul, et traitées avec le marqueur d'apoptose, les noyaux des cellules visualisées au microscope à fluorescence ne sont pas fluorescents. En revanche, les cellules qui ont été incubées en présence du MDEB 1mM et stimulées par la PHA 10 µg/ml, on remarque que le noyau perd son intégrité et il est fragmenté par rapport au contrôle. Le réactif du test TUNEL réagit avec les fragments d'ADN formés et produit au niveau des noyaux une fluorescence que nous avons quantifiée. Ainsi, le pourcentage d'apoptose dans ces cellules a été estimé à 30% (**figure 45**).

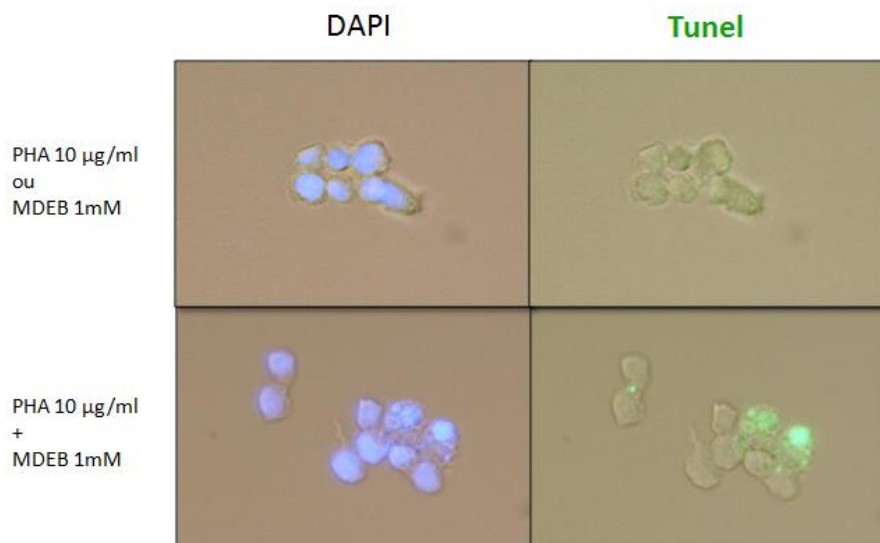


Figure 45. Le MDEB induit une mort cellulaire par apoptose dans les cellules Jurkat stimulées

Ces résultats montrent que le MDEB induit l'apoptose des cellules T Jurkat uniquement lorsqu'elles sont stimulées par la PHA. Cet effet explique la faible synthèse de l'IL-2 dans les cellules prétraitées pendant 24h avec le MDEB.

Le **tableau 2** récapitule les différents résultats des analogues du 2-APB sur le SOCE, les InsP₃Rs et la synthèse de l'IL-2 dans les cellules Jurkat.

| MOLECULE | EFFET SUR LE SOCE | | EFFET SUR INSP ₃ RS | | SYNTHESE DE L'IL-2 | |
|------------------|-----------------------|-----------------------|--------------------------------|-----------------|--------------------|------------|
| | IC ₅₀ (μM) | EC ₅₀ (μM) | Concentration | Effet | Concentration | Effet |
| 2-APB | 20 | 2 | | | | |
| METHOXY-APB | 10 | 2 | 3 | inhibition | | |
| DIMETHOXY-APB | 10 | 2 | 3 | inhibition | | |
| CYCLIC-APB | 3 | | 10 | inhibition | 10 | inhibition |
| BENZOTHIENYL-APB | 0.4 | | 3 | inhibition | 10 | inhibition |
| THIENYL-APB | 100 | 5 | 30 | inhibition | | |
| MDEB | | 50 | 1 000 | Absence d'effet | 1000 | inhibition |

Tableau2. Récapitulatif des effets des analogues du 2-APB sur le SOCE, InsP₃Rs et la synthèse de l'IL-2 dans les cellules Jurkat.

B. CARACTERISATION DE L'INFLUX SOCE DES PMN

La deuxième partie de notre travail consistait à étudier l'influx SOCE sur notre modèle de cellules proches de neutrophiles, les PLB-985 en utilisant comme outils les analogues du 2-APB caractérisés dans la première partie du projet. Nous avons décidé de continuer la caractérisation de deux molécules basée sur la capacité de potentialiser ou d'inhiber : le Benzothienyl-APB un puissant inhibiteur du SOCE et le MDEB un fort potentialisateur du SOCE.

XX. EFFETS DU 2-APB SUR L'INFLUX CALCIQUE DE TYPE SOCE

A. SOCE INDUIT PAR LA THAPSIGARGINE

Pour étudier les effets du 2-APB sur l'entrée calcique du type SOCE des PLB-985, les cellules ont été traitées avec de la TG 10 μM pendant 10 min, ensuite une gamme de concentrations de 2-APB a été testée sur ces cellules 30 secondes avant de rajouter le Ca^{2+} 2 mM (voir protocole décrit précédemment en **figure 16** Matériel et Méthodes). La courbe dose-réponse établie démontre la double activité du 2-APB avec une potentialisation à faibles dose [1-10 μM] et une inhibition à fortes doses [$> 30 \mu\text{M}$]. Le pic de potentialisation atteint à la concentration de 5 μM est de $(239 \pm 25\%, n=7)$. Le SOCE est inhibé à la concentration de 100 μM ($5,1 \pm 1\%, n=7$) (**figure 46**).

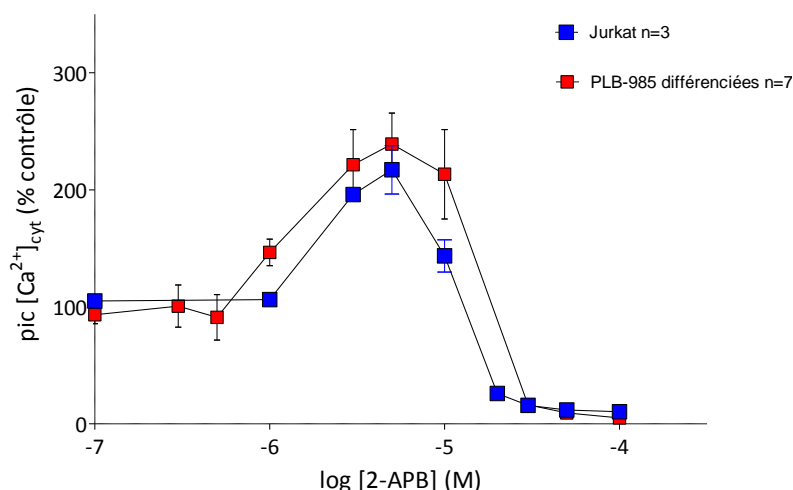


Figure 46. Courbe dose-réponse de l'effet du 2-APB sur le SOCE des cellules PLB-985 différenciées en phagocytes

En comparant les deux courbes dose-réponse du 2-APB dans les cellules PLB-985 et les cellules Jurkat, nous constatons que le 2-APB se comporte de la même manière dans les PLB-985 avec deux composantes : potentialisation à faibles doses et une inhibition à fortes doses, ce qui suggère que l'influx observé dans ces cellules est bien un influx SOCE.

B. SOCE INDUIT PAR LE PEPTIDE BACTERIEN fMLF

Pour étudier l'influx SOCE induit de manière physiologique, les cellules PLB-985 différenciées en cellules proches de neutrophiles ont été stimulées avec le peptide bactérien fMLF 1 μ M en absence du Ca^{2+} extracellulaire. Puis les cellules ont été traitées avec différentes concentrations de 2-APB [1- 100 μ M] avant d'ajouter 2 mM de Ca^{2+} extracellulaire. Nous avons pu établir la courbe dose-réponse de l'effet du 2-APB sur le SOCE induit par le fMLF.

L'effet du 2-APB sur le SOCE n'est pas très prononcé car l'influx calcique SOCE induit par le fMLF est faible pour permettre d'effectuer une courbe dose-réponse du 2-APB. Une faible potentialisation est observée entre 1 et 10 μ M avec un plateau entre 3 – 10 μ M qui atteint ($123 \pm 23\%$, $n=4$). Le profil de l'inhibition est similaire à

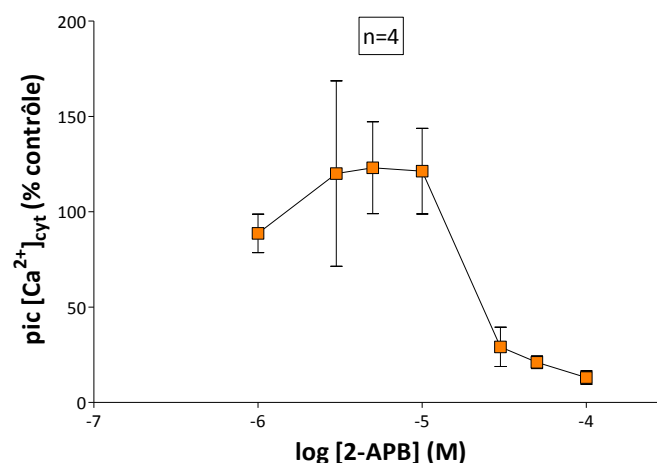


Figure 47. Courbe dose-réponse de l'effet du 2-APB sur l'influx Ca^{2+} induit par le fMLF

celui obtenu sous traitement avec la TG avec une inhibition à 100 μ M ($13,1 \pm 3,46\%$, $n=4$) (**figure 47**).

Afin de mieux comprendre les effets du 2-APB sur le SOCE des PLB-985 différenciées induit de manière physiologique, nous avons donc décidé d'utiliser le peptide WKYMVm comme un deuxième agent inducteur du SOCE dans ces cellules.

C. SOCE INDUIT PAR LE PEPTIDE WKYMVM

A faible concentrations [1-8 μ M] le 2-APB potentialise l'entrée de type SOCE induite par 1 μ M de WKYMVm. Le pic de potentialisation est obtenu à la concentration de 3 μ M et il atteint ($175 \pm 13\%$, $n=4$). L'inhibition est forte à 100 μ M ($5,9 \pm 1,1\%$, $n=4$) (**figure 48**).

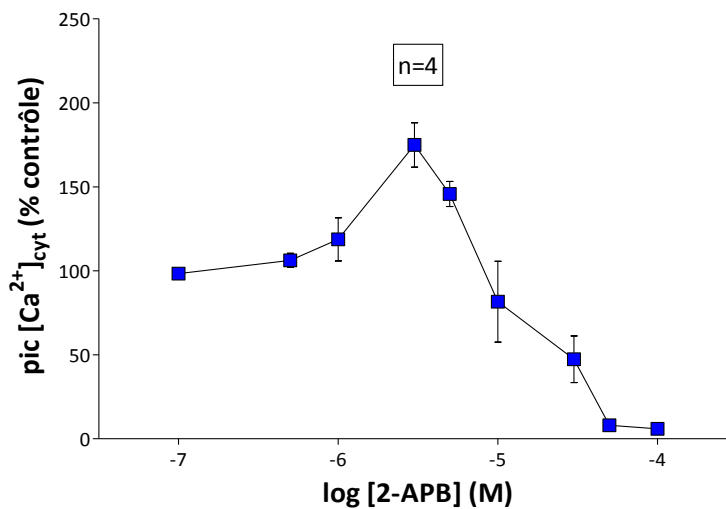


Figure 48. Courbe dose-réponse de l'effet du 2-APB sur l'influx Ca²⁺ induit par le WKYMVm

D. COMPARAISON ENTRE L'INFLUX SOCE SOUS DIFFERENTS

STIMULI

L'influx SOCE des PLB-985 différenciées a été comparé sous différents types de traitement, par la TG 1 μ M, le fMLF 1 μ M ou le WKYMVm. Nous avons montré dans ces cellules que l'influx SOCE suite à une stimulation par le fMLF est nettement plus faible que celui obtenu avec la TG ou le WKYMVm (**figure 49**). Une des hypothèses est que le faible influx calcique apparent qu'on observe avec le fMLF n'est en réalité que le produit des deux composantes (influx + efflux) avec un fort efflux des ions calciques pris en charge par les NCX et le transporteur *Plasma Membrane Ca²⁺ ATPase* (PMCA).

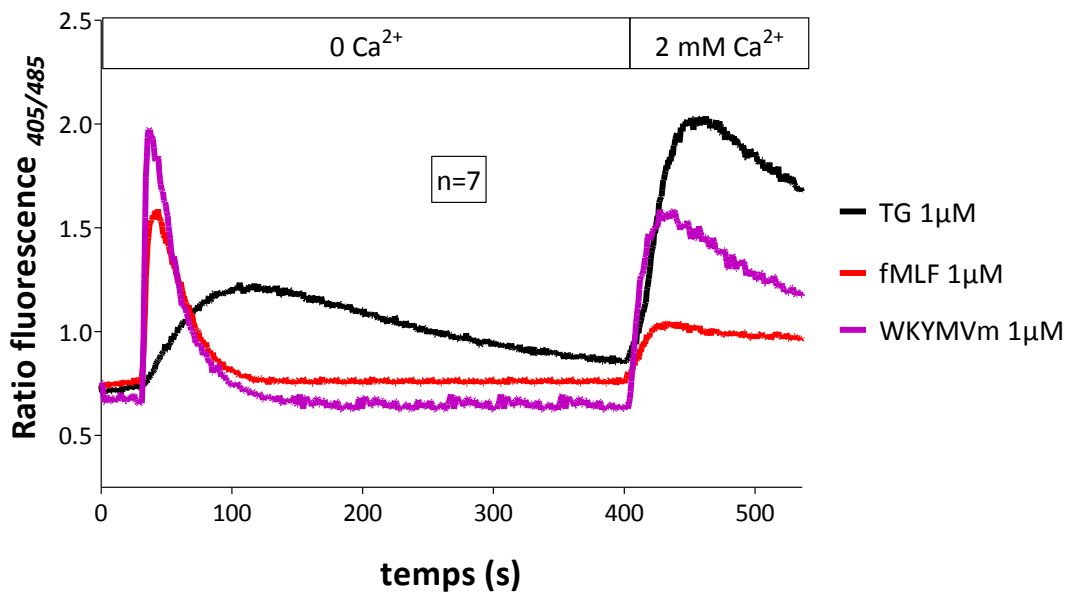


Figure 49. Une comparaison entre l'influx Ca²⁺ suite aux différents stimuli

Afin de mieux caractériser l'influx SOCE après une stimulation au fMLF sans prendre en compte l'efflux des ions Ca^{2+} , nous avons étudié l'influx des cations divalents comme le Baryum et le Manganèse qui entrent la cellule par les mêmes canaux calcique sans pouvoir être extrudés en dehors de la cellule.

XXI. INFLUX DU Ba^{2+}

Afin d'étudier l'influx des ions divalents (Ba^{2+}), les cellules PLB-985 différenciées ont été traitées en absence du Ca^{2+} extracellulaire avec 1 μM de TG, fMLF ou WKYMVm, puis 5 mM de BaCl_2 ont été ajoutés et l'influx de Ba^{2+} a été comparé. Après 400 secondes d'influx du Ba^{2+} , on ne constate pas de différence significative entre les différents stimuli (TG : 1102 nM \pm 248, n=3); (fMLF : 792 nM \pm 199, n=3); (WKYMVm : 1181 nM \pm 161, n=3) (**figure 50**). Les surfaces sous les courbes (SSC) de l'influx du Ba^{2+} pendant 400 s suite à stimulation avec la TG 1 μM , fMLF 1 μM ou WKYMVm 1 μM ont été mesurées et comparées et les moyennes ont été calculées et

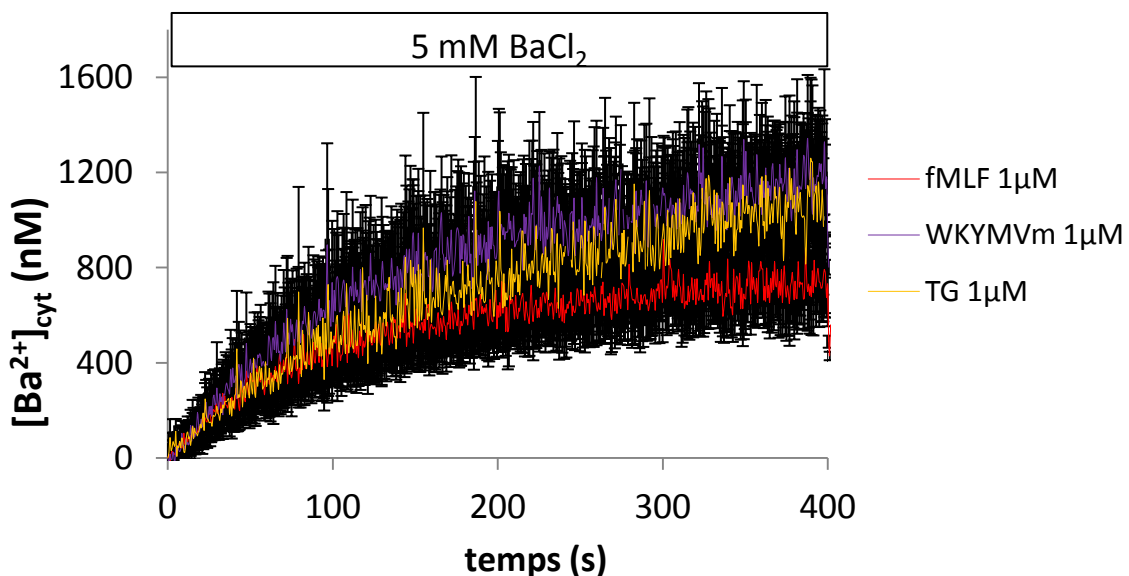


Figure 50 .Comparaison de l'influx du Ba^{2+} dans les PLB-985 différenciées suite aux différentes stimulations

exprimées en pourcentage avec les SEM (**figure 51**).

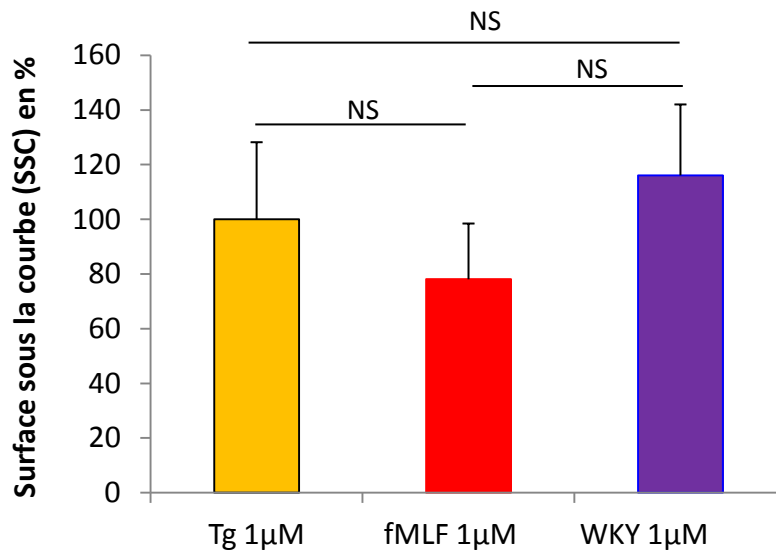


Figure 51. Comparaison des surfaces sous les courbes des influx du Ba²⁺ après 400 s. Les pourcentages des SSCs ont été calculés par rapport à la TG qui représente les 100%. NS: non significatif.

XXII. INFLUX DU MANGANESE

Ensuite nous avons comparé l'influx d'un autre cation divalent le Mn²⁺, qui a la particularité comme le Ba²⁺ de rentrer dans la cellule sans être extrudé, mais aussi il est capable d'éteindre la fluorescence de la sonde Fura-2. Après différents traitements de cellules PLB-985 différenciées, 300 µM de MnCl₂ ont été ajoutés pour permettre un influx massif du manganèse et ensuite éteindre la sonde Fura-2. En comparant l'influx du Mn²⁺ induit par différents stimuli, nous avons constaté que l'influx du Mn²⁺ après traitement avec le WKYMVm est plus important que l'influx du Mn²⁺ induit par le fMLF ou la TG (**figure 52**). La comparaison des pentes de l'influx sous les différentes stimulations est représentée en **figure 53**.

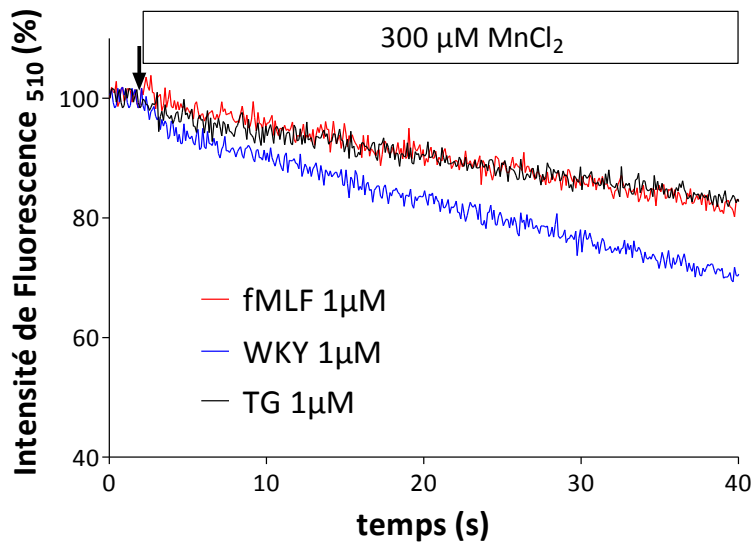


Figure 52. Comparaison de l'influx du Manganèse après différents traitements de cellules

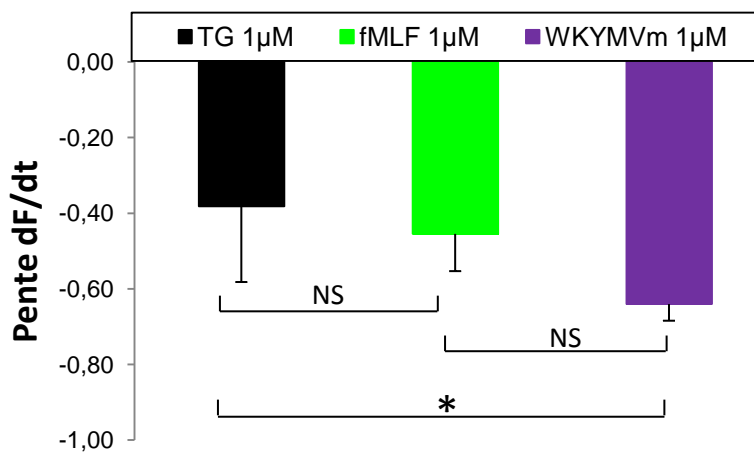


Figure 53. Comparaison des pentes de l'influx Mn^{2+} .

XXIII. EFFET DU BENZOTHIENYL-APB ET LE MDEB SUR L'INFLUX SOCE

A. SOCE INDUIT PAR THAPSIGARGINE

Les effets des analogues du 2-APB : le MDEB et le Benzothienyl-APB ont été étudiés sur l'entrée du Ca^{2+} SOCE induite par la TG $1\mu\text{M}$. Le MDEB à 1mM potentialise l'influx SOCE (ratio $^{405}/_{485} = 2,52 \pm 0,19$, $n=8$, $p < 0,05$) par rapport aux cellules traitées uniquement avec la TG (ratio $^{405}/_{485} = 2,01 \pm 0,23$, $n=8$). Le Benzothienyl-APB inhibe l'influx SOCE ($^{405}/_{485} = 1,10 \pm 0,03$, $n=8$). Un effet similaire du SKF-96365 (un inhibiteur du SOCE) à la concentration de $30\mu\text{M}$ a été observé (ratio $^{405}/_{485} = 1,13 \pm 0,07$, $n=8$) (figure 54).

Comme sur les cellules Jurkat, le SKF-96365 et le Benzothienyl-APB à la concentration de $30\mu\text{M}$ et $10\mu\text{M}$ respectivement inhibent l'entrée SOCE. Avec le MDEB à une concentration de 1mM , l'influx SOCE est plus important et plus soutenu dans le temps.

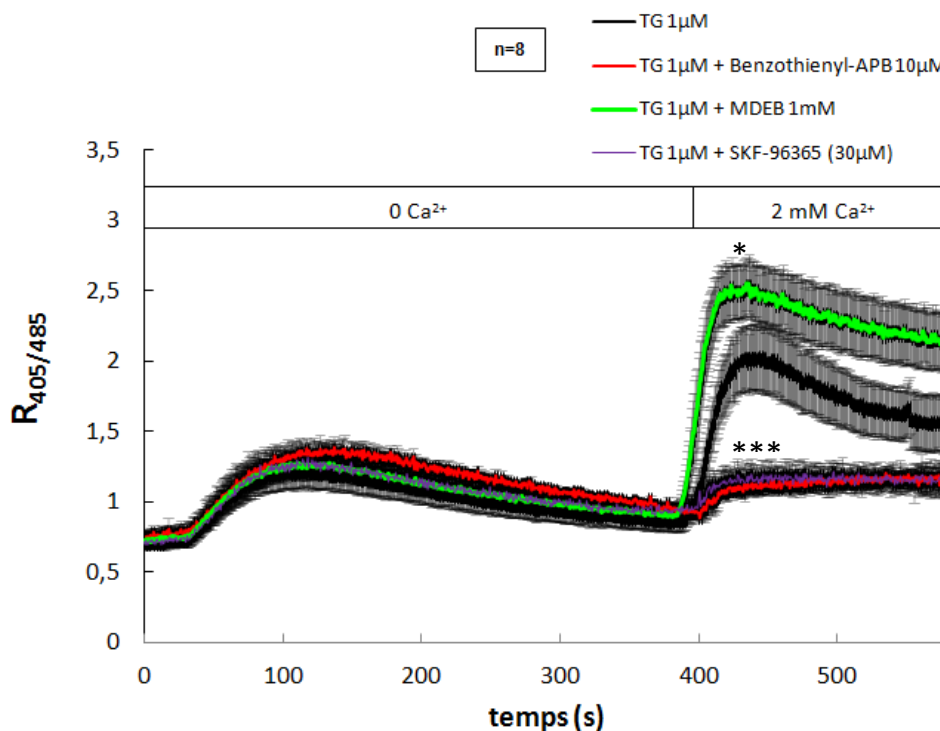


Figure 54. Effets du Benzothienyl-APB et du MDEB sur l'influx SOCE des PLB-985 différenciées induit par la TG

B. SOCE INDUIT PAR fMLF

Lors de la stimulation des cellules PLB-985 par le peptide bactérien fMLF 1 μ M, l'influx SOCE est faible pour pouvoir comparer l'effet du Benzothienyl-APB et le SKF-96365. En revanche, on constate une nette potentialisation de l'influx lors du traitement des cellules avec le MDEB 1 mM (ratio $^{405}/_{485} = 1,52 \pm 0,2$, n=8) par rapport au contrôle (ratio $^{405}/_{485} = 1,00 \pm 0,09$, n=8) (**figure 55**).

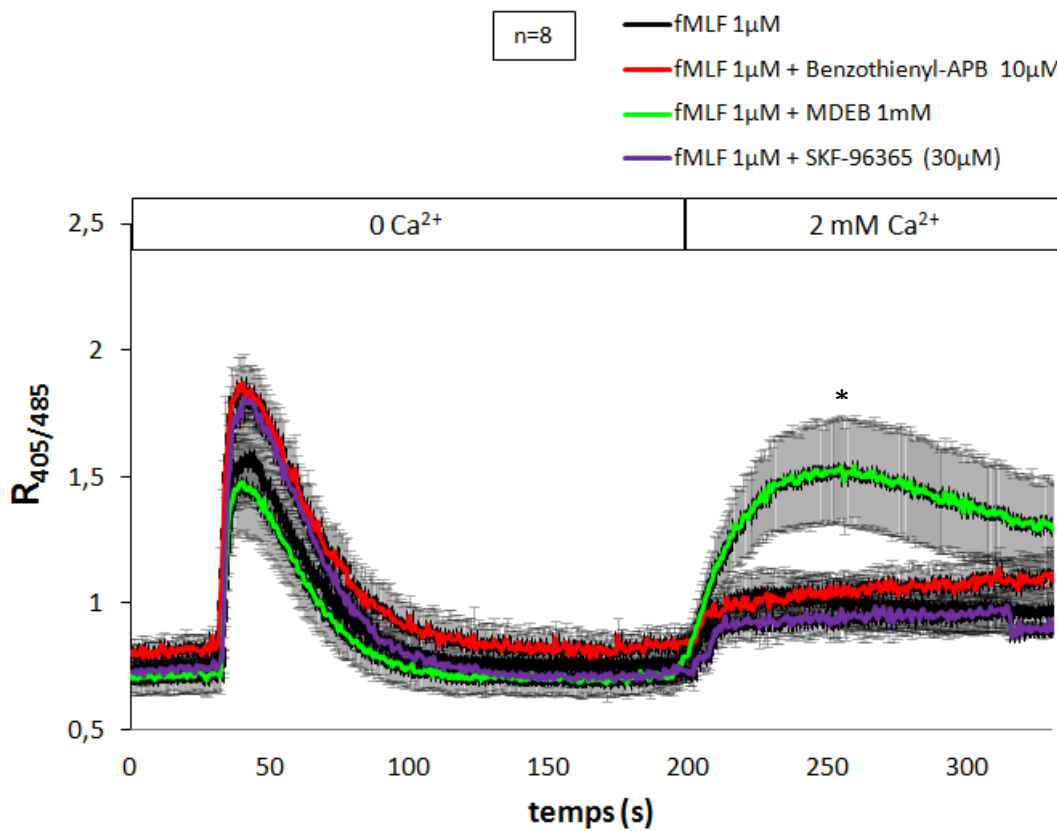


Figure 55. Effet du Benzothienyl-APB et du MDEB sur l'influx SOCE induit par le fMLF

XXIV. EFFET DU BENZOTHIENYL-APB ET LE MDEB SUR L'INFLUX Mn^{2+}

Nous avons étudié les effets des analogues du 2-APB, le Benzothienyl-APB et le MDEB sur l'influx du $MnCl_2$ suite aux différentes stimulations. Nous les avons comparés avec le SKF-96365 (30 μ M) en calculant les pentes correspondantes à l'intensité de l'influx sur un intervalle de 50 s immédiatement après l'ajout du $MnCl_2$.

A. STIMULATION fMLF

Le MDEB à 1 mM potentialise l'entrée de Mn^{2+} (pente $dF/dt = -0,82 \pm 0,2 \text{ s}^{-1}$) par rapport aux cellules uniquement stimulées par le fMLF 1 μ M ($dF/dt = -0,45 \pm 0,11 \text{ s}^{-1}$). Le SKF-96363 à 30 μ M inhibait partiellement l'influx du Mn^{2+} ($dF/dt = -0,26 \pm 0,08 \text{ s}^{-1}$) tandis que le Benzothienyl-APB inhibe complètement l'entrée du Manganèse ($dF/dt = -0,04 \pm 0,005 \text{ s}^{-1}$) (figure 56, 57).

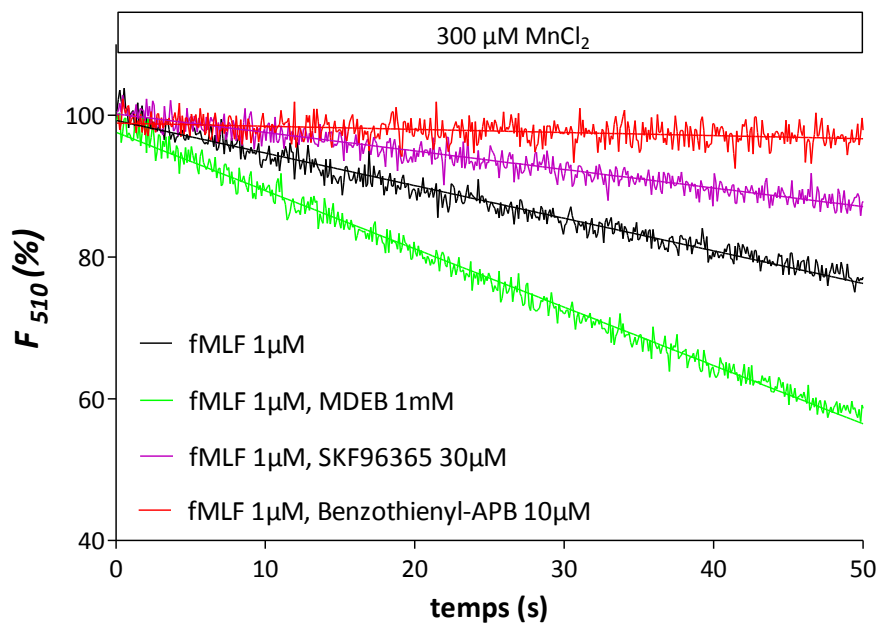


Figure 56. Effets du MDEB et du Benzothienyl-APB sur l'influx du Mn^{2+}

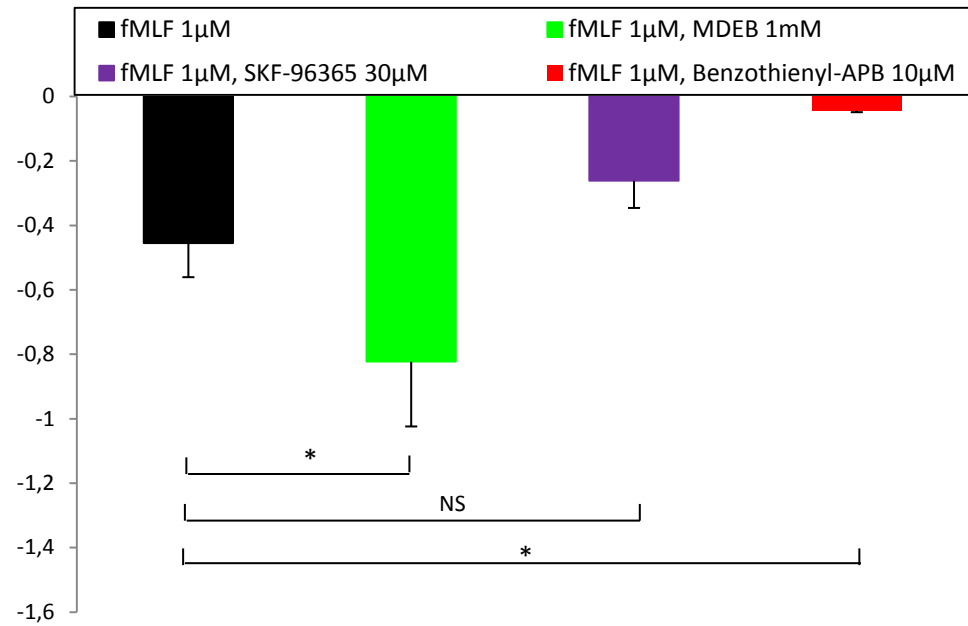


Figure 57. Comparaison des pentes de l'influx Mn²⁺

B. STIMULATION WKYMVM

Lorsque les cellules ont été stimulées avec le WKYMVM 1µM puis traitées avec le MDEB 1 mM, nous avons remarqué une augmentation d'influx du Mn²⁺ ($dF/dt = -0,80 \pm 0,15 \text{ s}^{-1}$) par rapport aux contrôles ($dF/dt = -0,64 \pm 0,21 \text{ s}^{-1}$). Le SKF-96365 inhibe l'entrée du Mn²⁺ ($dF/dt = -0,27 \pm 0,11 \text{ s}^{-1}$). Tandis que le Benzothienyl-APB inhibe complètement l'entrée du Manganèse avec une pente à ($dF/dt = -0,06 \pm 0,008 \text{ s}^{-1}$) (figure 58, 59).

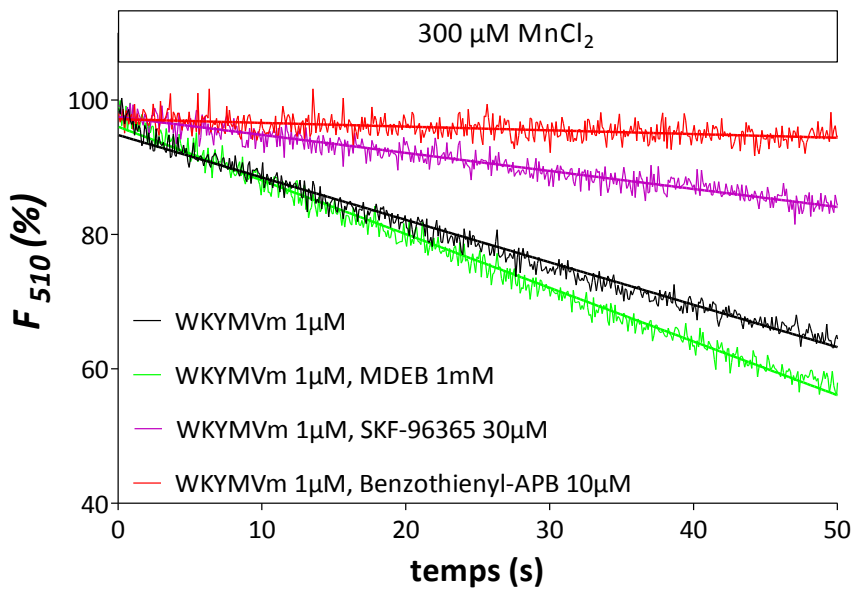


Figure 58. Effet du MDEB et du benzothienyl-APB sur l'influx du Mn^{2+} après stimulation des cellules PLB-985 différenciées avec le WKYMVm

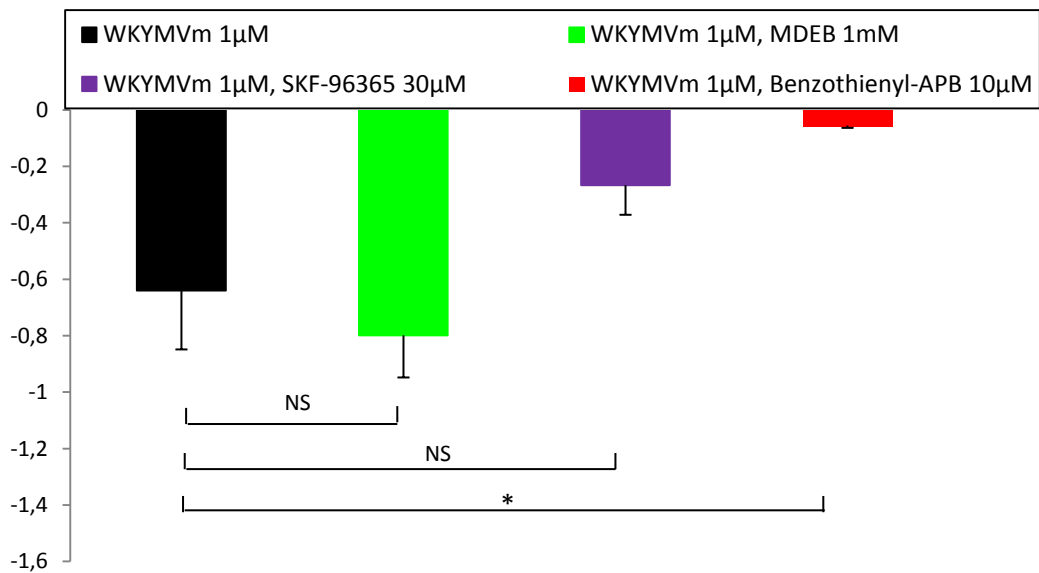


Figure 59. Comparaison des pentes d'influx du Mn^{2+} après stimulation des cellules avec le WKYMVm

C. STIMULATION THAPSIGARGINE

Avec le MDEB on ne retrouve pas le même effet de potentialisation ($dF/dt = -0,41 \pm 0,1 \text{ s}^{-1}$). Son effet est comparable à l'influx du Mn^{2+} dans les cellules contrôles traitées avec la TG seule ($dF/dt = -0,38 \pm 0,2 \text{ s}^{-1}$). Tandis qu'avec le SKF-96365 30 μM et le Benzothienyl-APB l'influx de Mn^{2+} a été inhibé respectivement de ($dF/dt = -0,22 \pm 0,04 \text{ s}^{-1}$) et ($dF/dt = -0,05 \pm 0,007 \text{ s}^{-1}$) (figures 60 et 61).

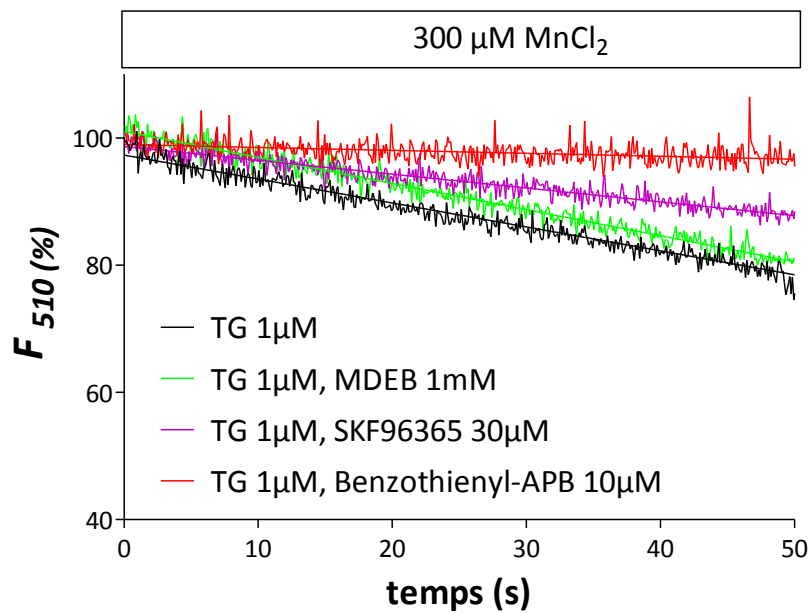


Figure 60. Effet du MDEB et du Benzothienyl-APB sur l'influx Mn^{2+} après un traitement à la TG

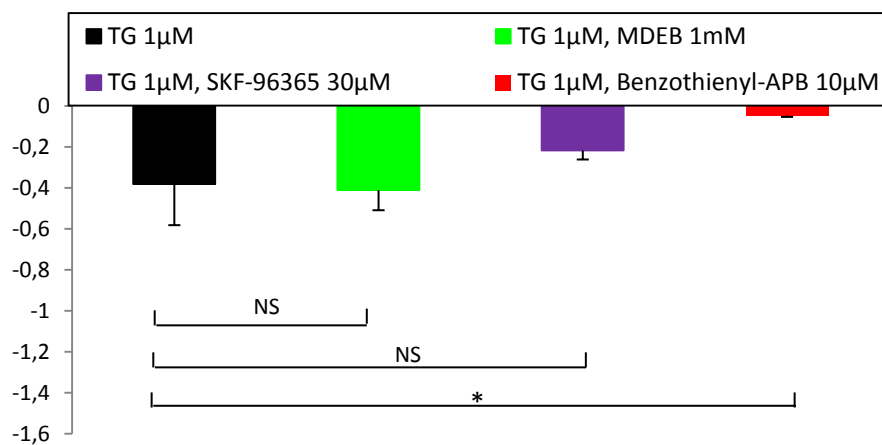


Figure 61. Comparaison des pentes de l'influx Mn^{2+} des composés MDEB et Benzothienyl-APB après traitement à la TG

Le Benzothienyl-APB inhibe l'entrée du Mn^{2+} dans les différentes conditions de stimulation par fMLF, WKYMVm ou par TG.

Le MDEB potentialise l'entrée du Mn^{2+} après une stimulation au fMLF et WKYMVm mais on remarque une absence de potentialisation après stimulation avec la TG.

XXV. MESURE DE LA PHAGOCYTOSE ET LA PRODUCTION DE FRO INTRAPHAGOSOMALES

Après avoir caractérisé l'influx du Ca^{2+} , et avoir étudié l'entrée d'autres cations divalents, nous nous sommes intéressés à évaluer les effets du Benzothienyl-APB et le MDEB sur le fonctionnement des cellules PLB-985 différenciées.

A. PHAGOCYTOSE DES LEVURES PAR LES CELLULES PLB-985

A l'aide de la cytométrie en flux, la mesure simultanée de la phagocytose et la production de FRO a été réalisée afin d'étudier les effets des analogues : MDEB et le Benzothienyl-APB sur les fonctions des PLB-985 différenciées en phagocytes.

Le traitement des cellules PLB-985 différenciées avec le benzothienyl-APB à 10 μ M inhibe la phagocytose en présence de 2 mM Ca^{2+} ($43,19 \pm 4,97$ %, n=8, p < 0,05) et en absence du Ca^{2+} ($56,62 \pm 5,20$ %, n=7, p < 0,05). Le SKF-96365 à 30 μ M inhibe également la phagocytose en présence du Ca^{2+} ($36,61 \pm 4,62$ %, n=7, p < 0,05) et en absence du Ca^{2+} ($43,51 \pm 2,97$ %, n=7, p < 0,05). Le MDEB malgré son effet potentialisateur du SOCE il inhibe aussi la phagocytose des levures en présence du Ca^{2+} ($55,08 \pm 8,55$ %, n=8, p < 0,05) et en absence du Ca^{2+} ($62,79 \pm 10,75$ %, n=7, p < 0,05) (**figure 62**).

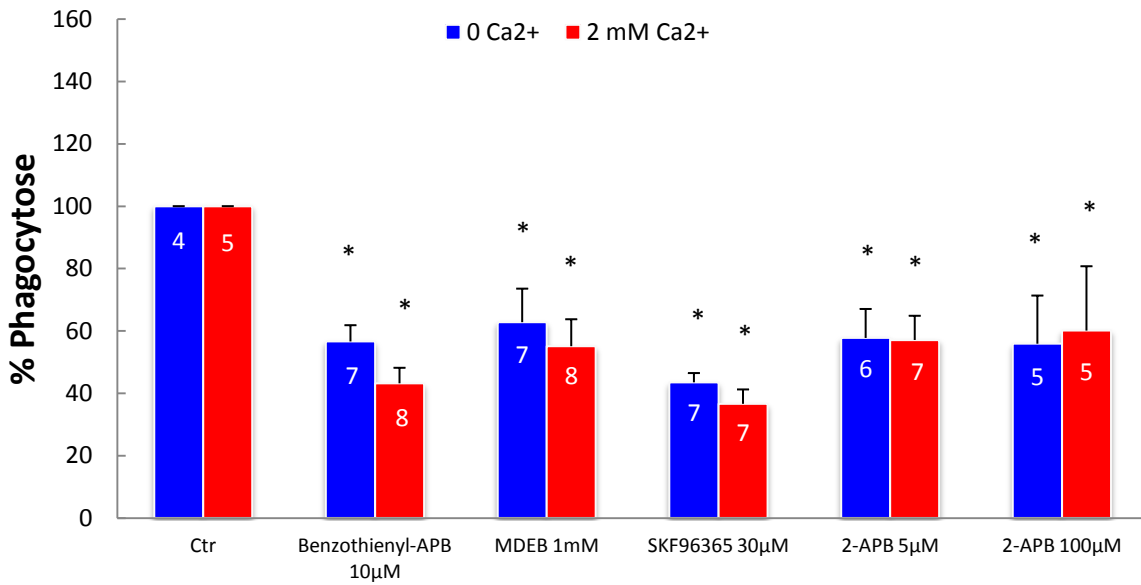


Figure 62. Effets du MDEB et du Benzothienyl-APB sur la phagocytose des levures *S.cerevisiae* par les PLB-985 différenciées. Au niveau de chaque barre est représenté le nombre d'expériences. Une étoile représente un résultat significatif par rapport au contrôle $p < 0,05$.

Enfin, les intensités de fluorescence moyenne (IFM) (*Mean Fluorescence Intensity MFI*) ont été ensuite comparées. Ce paramètre traduit le nombre de levures phagocytées par une cellule PLB-985. Les résultats de l'analyse montrent que l'IFM ne varie pas suite aux différents traitements (**figure 63**).

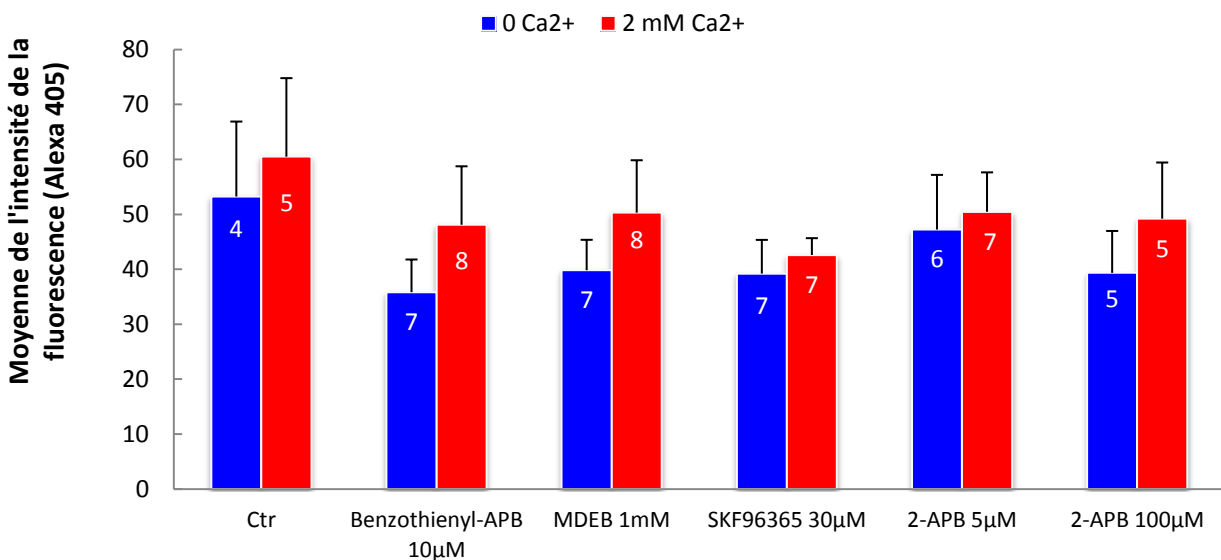


Figure 63. Représentation des intensités de fluorescence moyenne d'Alexa Fluor 405

B. PRODUCTION DE FRO INTRAPHAGOSOMALES

Très peu de cellules PLB-985 différenciées produisent des FRO lorsqu'elles ont été traitées par le Benzothienyl-APB comparées aux contrôles (en présence du Ca^{2+} : $10,14 \pm 2,35$ %, $n=8$, $p < 0,005$) et ($12,60 \pm 3,32$ %, $n=7$, $p < 0,005$ en absence du Ca^{2+} extracellulaire). Le même effet est constaté avec le SKF-96365 (en présence du Ca^{2+} : $14,99 \pm 4,77$ %, $n=7$, $p < 0,005$) et ($14,15 \pm 3,8$ %, $n=7$, $p < 0,005$ en absence du Ca^{2+}). Le MDEB à 1 mM a inhibé partiellement la production de FRO (en présence du Ca^{2+} : $52,72 \pm 15,30$ %, $n=8$) et ($66,05 \pm 21,65$ %, $n=7$ en absence du Ca^{2+}) (**figure 64**).

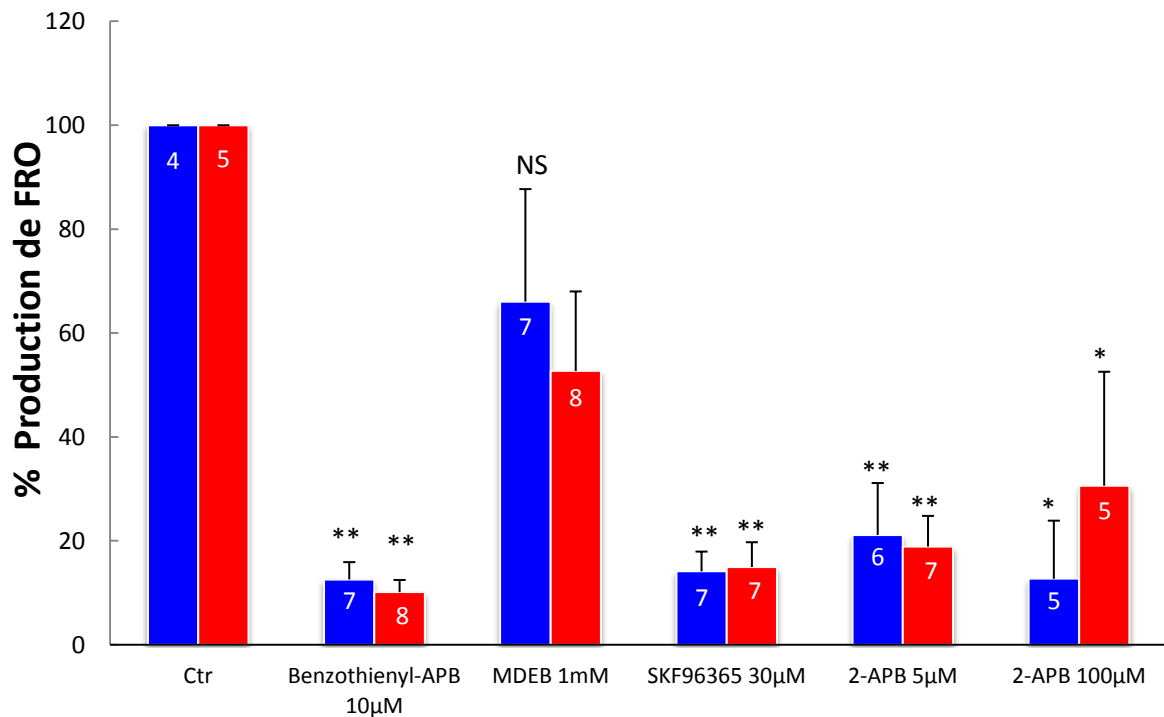


Figure 64. Effet du Benzothienyl-APB et du MDEB sur la production des FRO dans les cellules PLB-985 différenciées

XXVI. MESURE DE LA PRODUCTION DE FRO EXTRACELLULAIRES

Ensuite nous nous sommes intéressés à étudier les effets des analogues du 2-APB (Benzothienyl-APB et MDEB) sur la production de FRO par les cellules PLB-985 différenciées induite par un autre type de stimulation qui implique le peptide bactérien chimio-attractant le fMLF.

A. CHIMILUMINESCENCE DU LUMINOL

1. STIMULATION AU fMLF

a) Le Benzothienyl-APB inhibe complètement la production de FRO

La réaction du luminol avec les peroxydes d'hydrogènes (H_2O_2) produits lors de la stimulation des cellules par les peptides bactériens, a été mise en évidence par chimiluminescence dans le lecteur de plaques. Grâce à cette technique nous avons mesuré les FRO produites par les cellules PLB-985 différenciées traitées ou non par les molécules : le Benzothienyl-APB, le MDEB en comparaison avec le 2-APB et le SKF-96365.

Les cellules PLB-985 stimulées avec le fMLF $1\mu M$ dans un milieu en présence du Ca^{2+} produisaient plus de FRO, le pic atteint (3355 ± 245 cps, $n=3$) après $35,71 \pm 3,57$ s suite à la stimulation. Dans les cellules stimulées en absence du Ca^{2+} extracellulaire, le pic atteint (2255 ± 500 cps, $n=3$) après 28,57 s.

Le benzothienyl-APB à $10\ \mu M$ inhibe complètement la production de FRO dans les cellules PLB-985 stimulées par le fMLF $1\mu M$ en présence du Ca^{2+} (70 ± 20 cps, après 35,71 s, $n=3$) par rapport aux cellules contrôles (pic : 3355 ± 245 cps, $n=3$). Le même effet est observé dans les cellules stimulées en absence du Ca^{2+} externe (**figure 65**). Le

calcul des surfaces sous les courbes confirme l'inhibition totale de la production de FRO par le Benzothienyl-APB (figure 66).

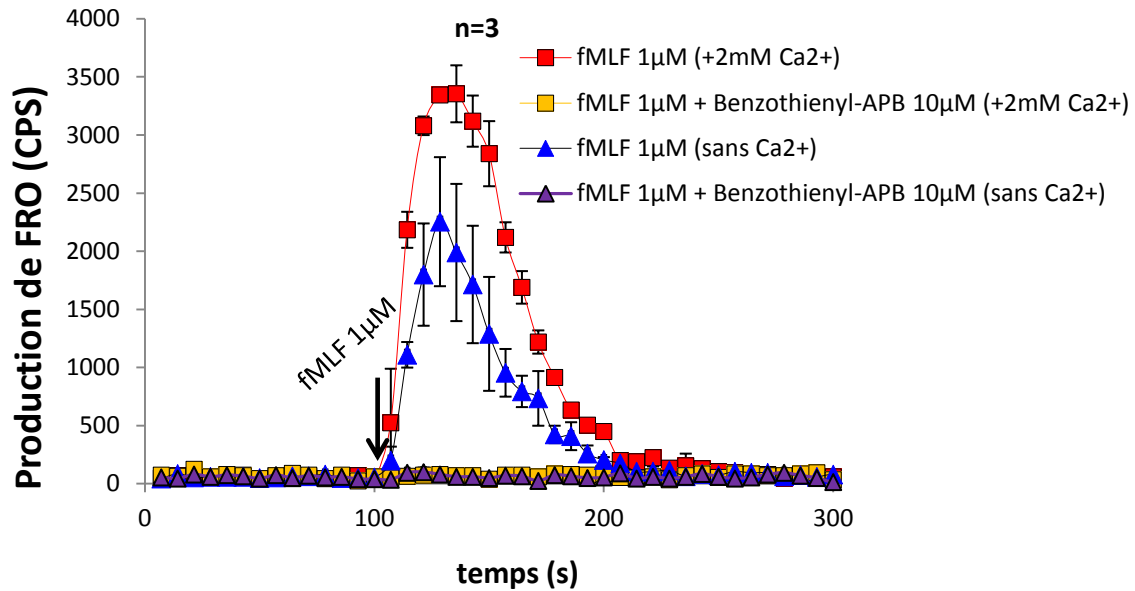


Figure 66. Effets du Benzothienyl-APB sur la production de FRO

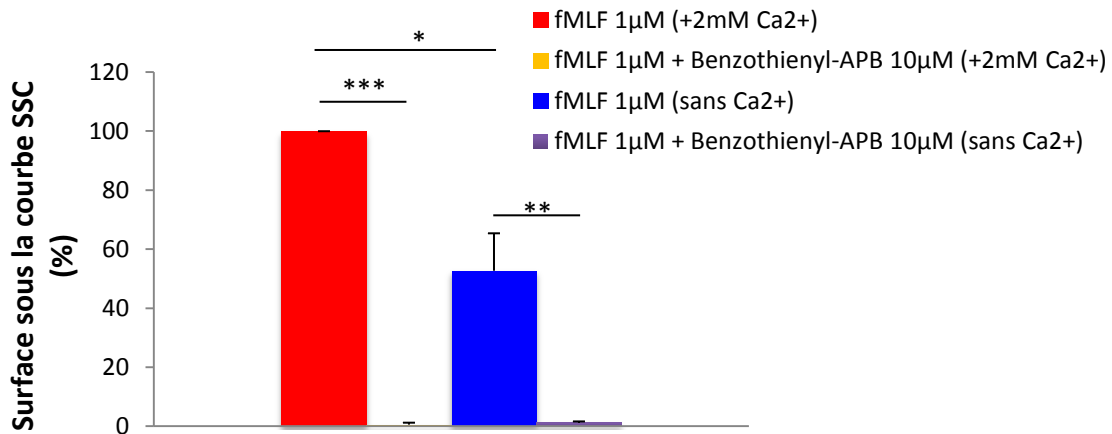
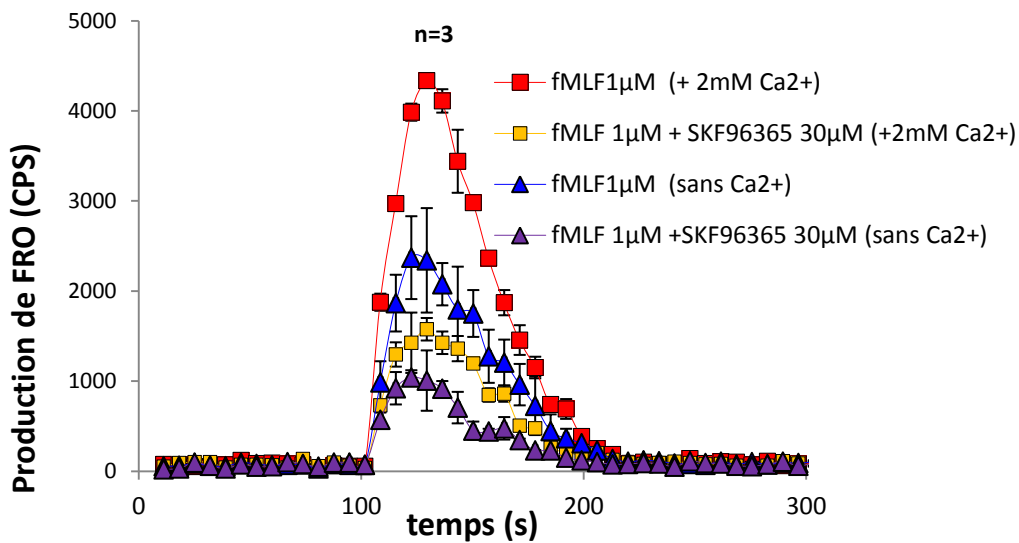


Figure 65. Comparaison des surfaces sous les courbes de l'effet du Benzothienyl-APB sur la production de FRO

**b) INHIBITION PARTIELLE DE LA PRODUCTION DE FRO PAR LE
SKF-96365**

En présence du Ca^{2+} , le traitement des cellules avec $30 \mu\text{M}$ du SKF-96365 réduit la production des FRO (pic : 1575 ± 125 cps, $n=3$) par rapport aux cellules uniquement stimulées par le fMLF $1 \mu\text{M}$ (pic : 4335 ± 75 cps, $n=3$). Dans les conditions en absence de Ca^{2+} , on retrouve le même effet du SKF-96365 avec une inhibition partielle de la production de FRO (pic : 920 ± 100 cps) par rapport aux cellules contrôles (pic : 2370 ± 500 cps, $n=3$) (**figure 67**). Le calcul des surfaces sous courbes (SSC) confirme une inhibition partielle de la production de FRO par le SKF (SSC= $37,56 \pm 4,25$ %, $n=3$, $p < 0,05$, en présence du Ca^{2+}) par rapport aux contrôles (**figure 68**).



**Figure 67. Le SKF-96365 inhibe partiellement la production de FRO
dans les PLB-985**

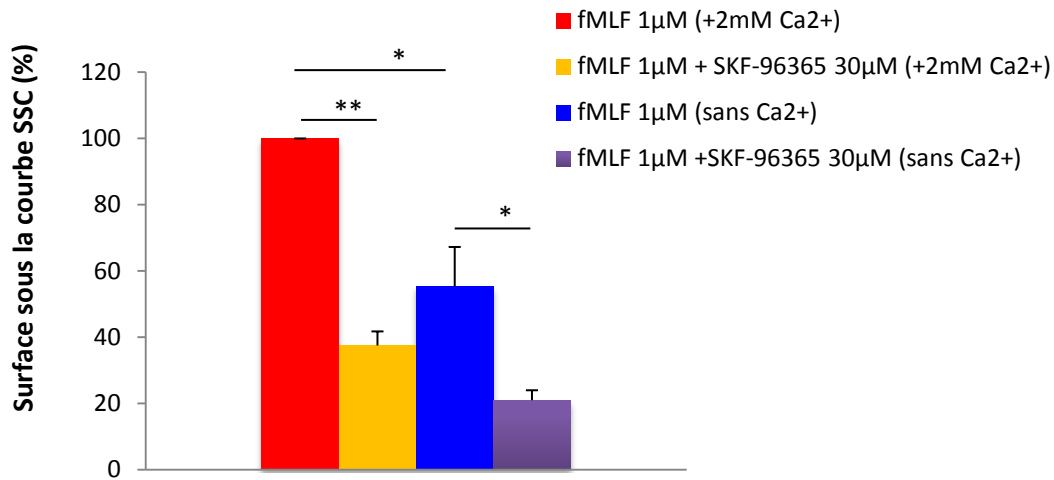


Figure 68. Comparaison des surfaces sous les courbes de l'effet du SKF-96365 sur la production de FRO

c) Le 2-APB inhibe complètement la production de FRO

En présence du Ca²⁺, le 2-APB à faible concentration 5 µM inhibe la production de FRO des cellules PLB-985 (pic : 365 ± 155 cps, n=3) par rapport aux cellules contrôles (pic : 3965 ± 465 cps). Idem pour les cellules en absence du Ca²⁺, le 2-APB produit très peu de FRO (pic : 235 ± 115 cps, n=3) (**figure 69**). Le calcul des surfaces sous courbes (SSC) confirme une forte inhibition de la production de FRO par le 2-APB à 5 µM (SSC= 5,68 ± 3,66 %, n=3, p < 0,05, en présence du Ca²⁺) par rapport aux contrôles (**figure 70**). Un résultat surprenant dans la mesure où le 2-APB à 5 µM potentialise le SOCE.

En présence ou en absence du Ca²⁺, le traitement des cellules avec le 2-APB à forte concentration 100 µM supprime complètement les FRO (pic : 100 ± 20 cps, n=3) par rapport aux cellules uniquement stimulées par le fMLF 1µM (pic : 3620 ± 190 cps, n=3) (**figure 71**). En calculant les SSC, nous constatant que le 2-APB à 100 µM inhibe totalement la production de FRO (SSC= 0,13 ± 0,07 %, n=3, p < 0,05, en présence du Ca²⁺) par rapport aux contrôles (**figure 72**).

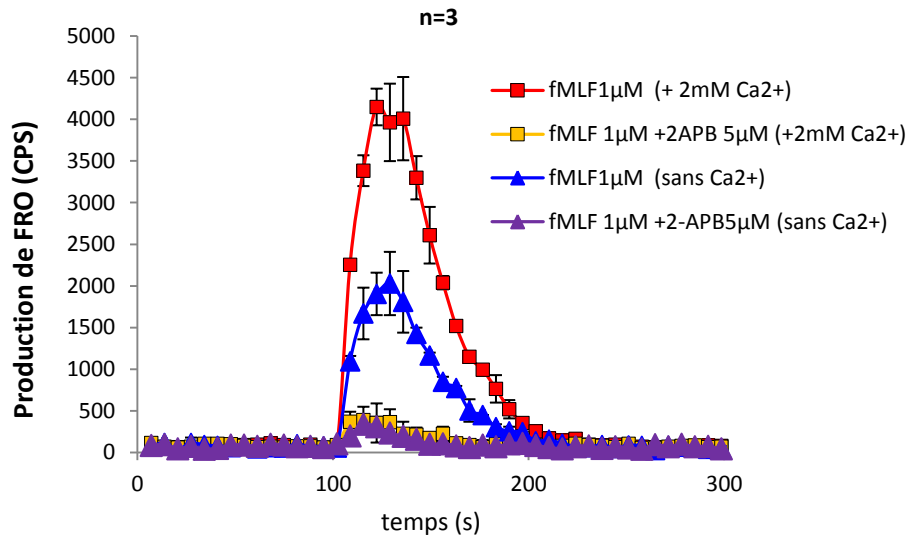


Figure 69. Les cellules traitées par le 2-APB à 5µM ne produisent que peu de FRO

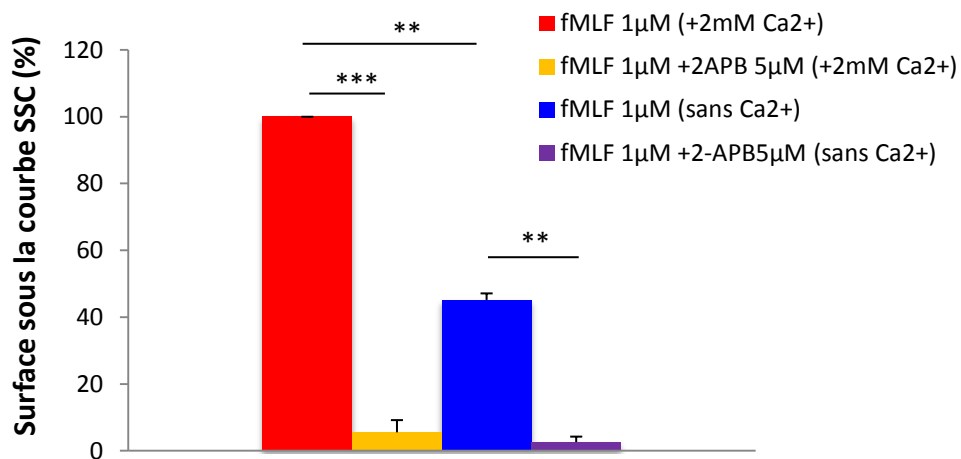


Figure 70. Comparaison des surfaces sous les courbes de l'effet du 2-APB 5µM sur la production de FRO

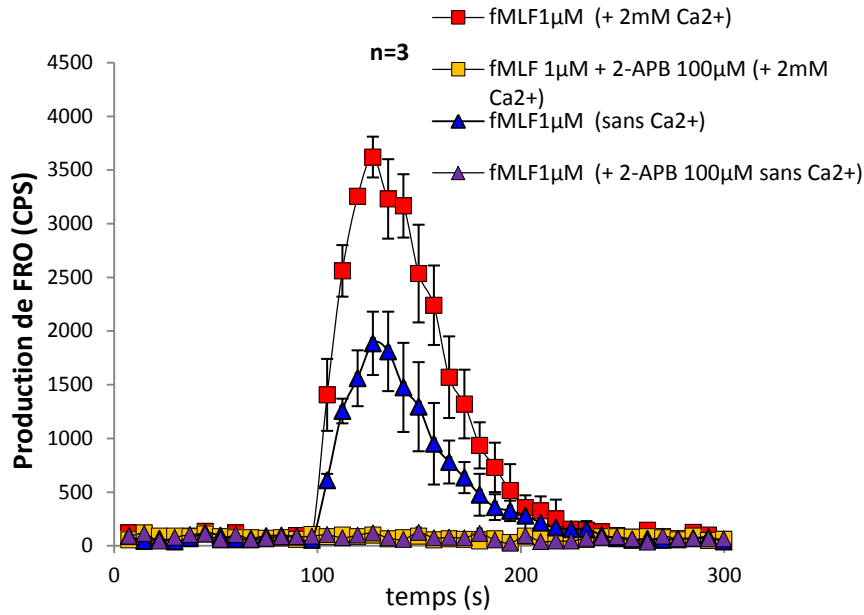


Figure 71. Le 2-APB à 100 µM supprime complètement la production de FRO

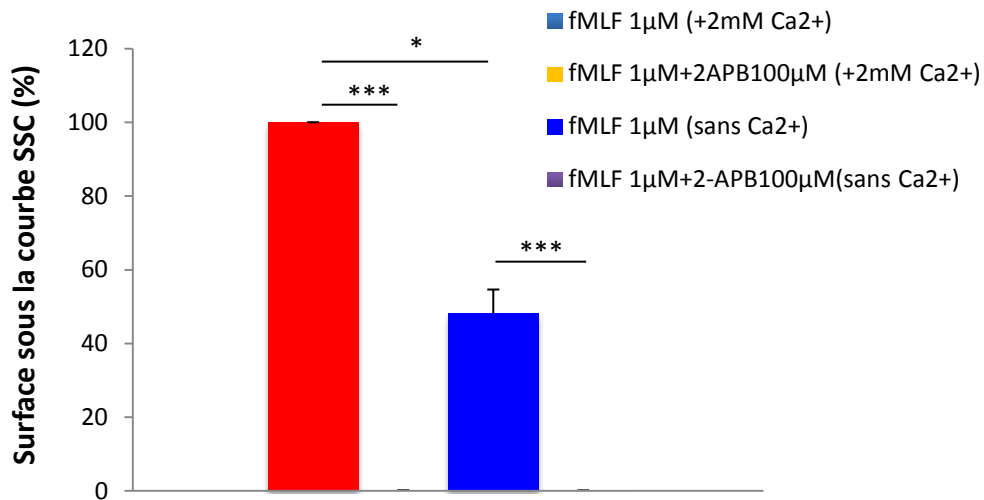


Figure 72. Comparaison des surfaces sous les courbes de l'effet du 2-APB 5µM sur la production de FRO

d) INTERFERENCE DU MDEB AVEC LA MESURE AU LUMINOL

Les cellules ont été traitées avec du MDEB 1mM, puis stimulées avec le fMLF 1 μ M. Le niveau de base de FRO était déjà augmenté avant même de stimuler les cellules avec le fMLF (**figure 73**). Deux hypothèses sont envisageables : soit le MDEB induit une augmentation de production de FRO même en absence de stimulation.

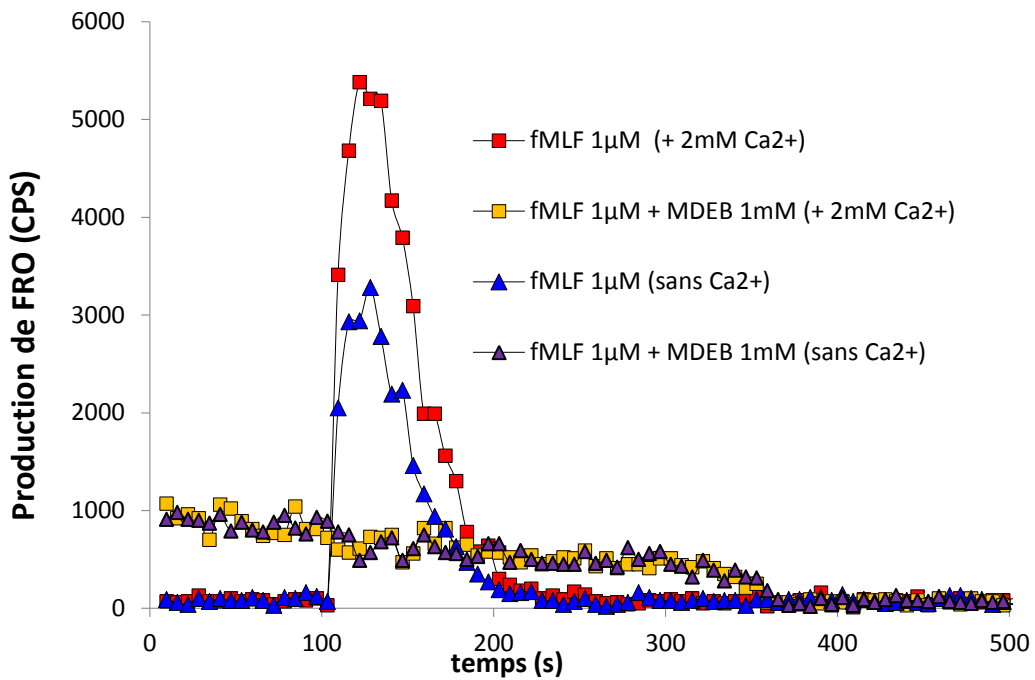


Figure 73. Effet du MDEB sur la production de FRO par les cellules PLB-985

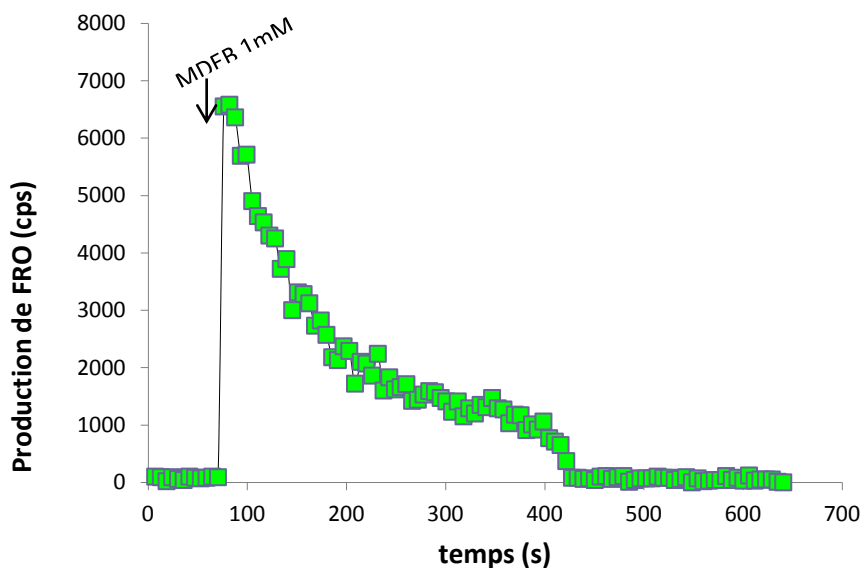


Figure 74. Le MDEB seul augmente le signal de chimiluminescence

Soit c'est un produit oxydant par lui-même. Afin de clarifier le rôle du MDEB, nous avons réalisé la même expérience mais dans un milieu en absence de cellules et dans ces conditions nous avons constaté que le MDEB 1 mM induit par lui-même une augmentation considérable du signal de chimiluminescence (**figure 74**)

2. STIMULATION AU PHORBOL MYRISTATE ACETATE (PMA)

Nous avons voulu étudier des éventuelles interactions des analogues du 2-APB avec les FRO produites par les cellules PLB-985 différenciées. Des interactions indépendantes de leurs effets sur la signalisation calcique. Pour cela, nous avons stimulé les cellules PLB-985 avec un activateur de la NADPH oxydase, le Phorbol Myristate Acétate (PMA) qui induit une production prolongée de FRO.

a) Le Benzothienyl-APB neutralise les FRO

Les cellules PLB-985 stimulées avec le PMA 200 nM produisent de FRO, lorsque le plateau est atteint après 100 secondes, nous avons ajouté 10 μ M de Benzothienyl-APB pour étudier un éventuel effet neutralisant de ce composé sur les FRO produites. Le résultat est que le Benzothienyl-APB supprime les FRO produites dans le milieu. En revanche, nous n'avons constaté de différence en présence ou en absence du Ca^{2+} extracellulaire car l'effet du PMA sur la production de FRO est indépendant du Ca^{2+} (**figure 75**).

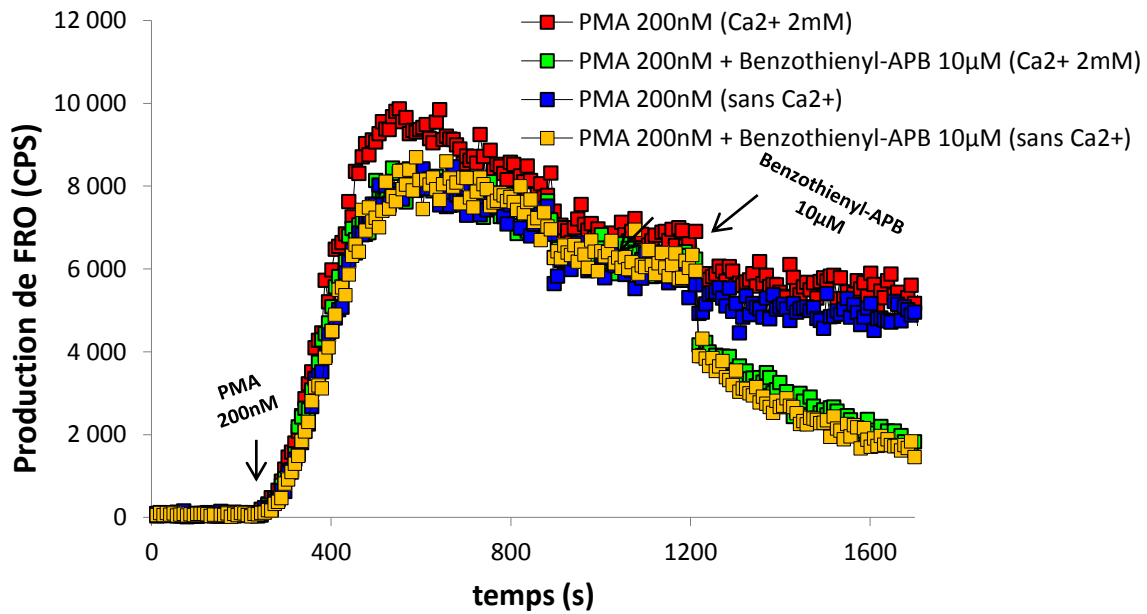


Figure 75. Effet du benzothienyl-APB sur la production de FRO induite par le PMA 200 nM

b) EFFET DU 2-APB

Le traitement des cellules PLB-985 avec du 2-APB à 5 µM neutralise faiblement les FRO produites lors d'une stimulation par le PMA 200 nM. En revanche le 2-APB à 100 µM supprime totalement les FRO produites (**figure 76, 77**).

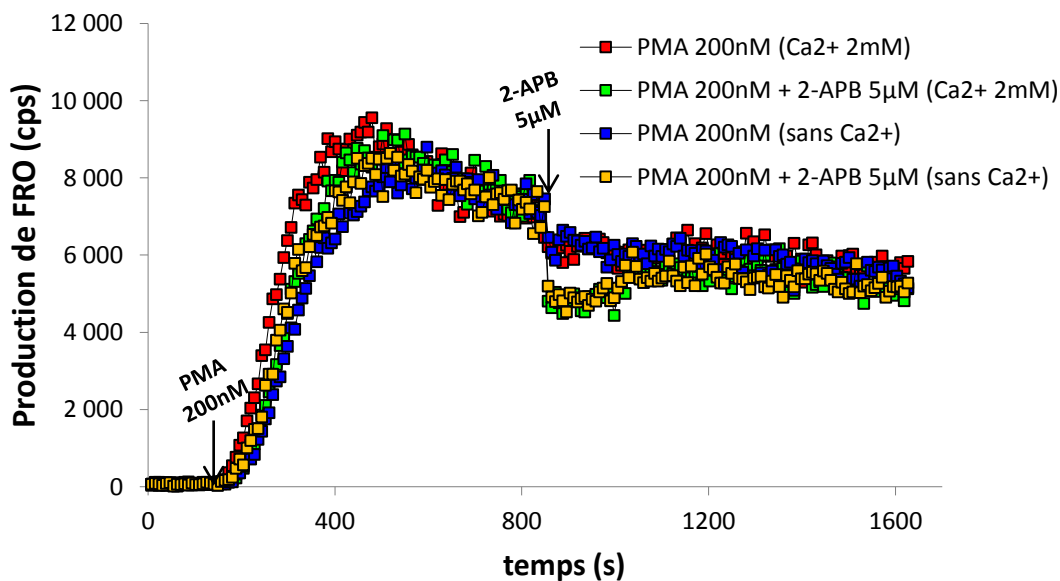


Figure 76. Effet du 2-APB à 5 µM sur les FRO produites par les PLB-985 stimulées avec le PMA 200 nM

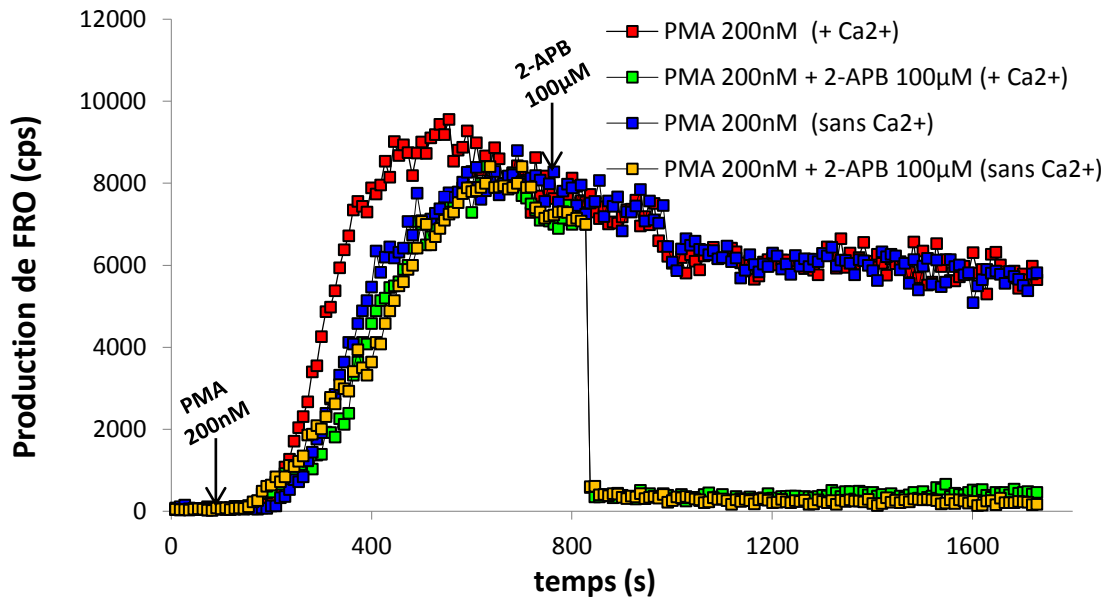


Figure 77. Effet du 2-APB à 100 µM sur les FRO produites par les cellules stimulées avec le PMA 200nM

c) Effet du MDEB

Le traitement des cellules PLB-985 avec le MDEB 1 mM au niveau du plateau baisse considérablement les quantités de FRO produites lors de la stimulation par le PMA. Mais cet effet survient en deux phases: un pic comparable à celui obtenu dans un milieu ne contenant pas de cellules (**figure 74**) suivi d'une neutralisation complète des FRO (**figure 78**).

Ces résultats montrent que le MDEB à 1 mM et le 2-APB à 100 µM neutralisent totalement et rapidement les FRO produites après une stimulation des cellules PLB-985 avec le PMA à 200 nM. En revanche, le Benzothienyl-APB à 10 µM interagit avec les FRO produites et les neutralise plus lentement.

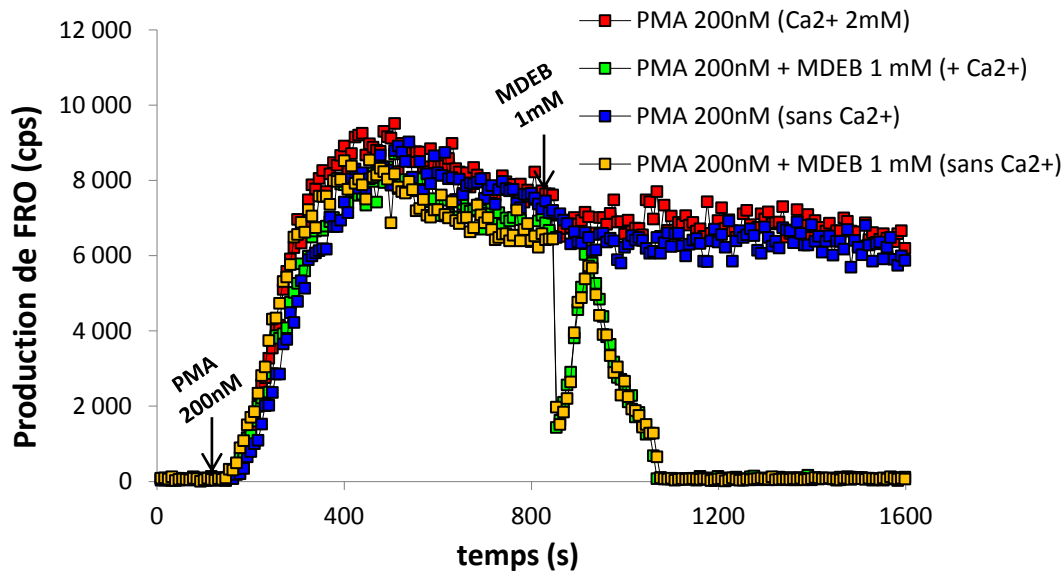


Figure 78. Effet du MDEB les FRO générées par les PLB-985

XXVII. MESURE SIMULTANEE DU CALCIUM ET DE LA PRODUCTION DE FRO

A l'aide de l'Amplex UltraRed nous avons pu suivre simultanément les variations du calcium cytosolique et la production de FRO correspondante. La stimulation des cellules par le peptide bactérien fMLF 1 μ M induit une augmentation transitoire de la $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$ parallèle à une production de FRO. L'ajout de 2 mM de $CaCl_2$ extracellulaire provoque un influx SOCE qui est aussi associée à une production de FRO (**figure 79**). Ensuite les mêmes expériences ont été faites en suivant le même protocole mais en stimulant le SOCE par la TG (**figure 80**) et le WKYMVm (**figure 81**).

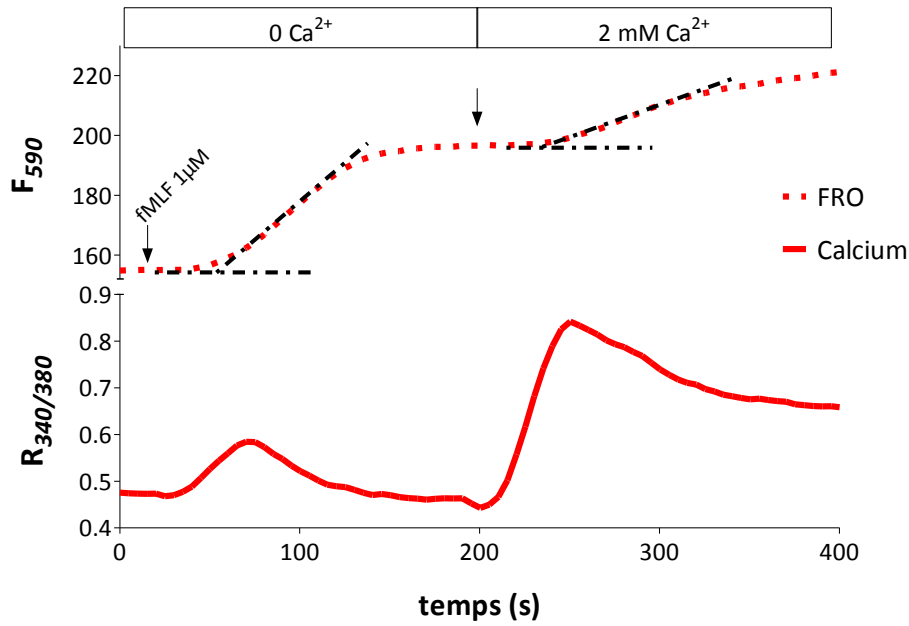


Figure 79. Mesure simultanée de la $[Ca^{2+}]_{cyt}$ et la production de FRO par les cellules PLB-985 différenciées stimulées avec le fMLF. La figure représente une expérience.

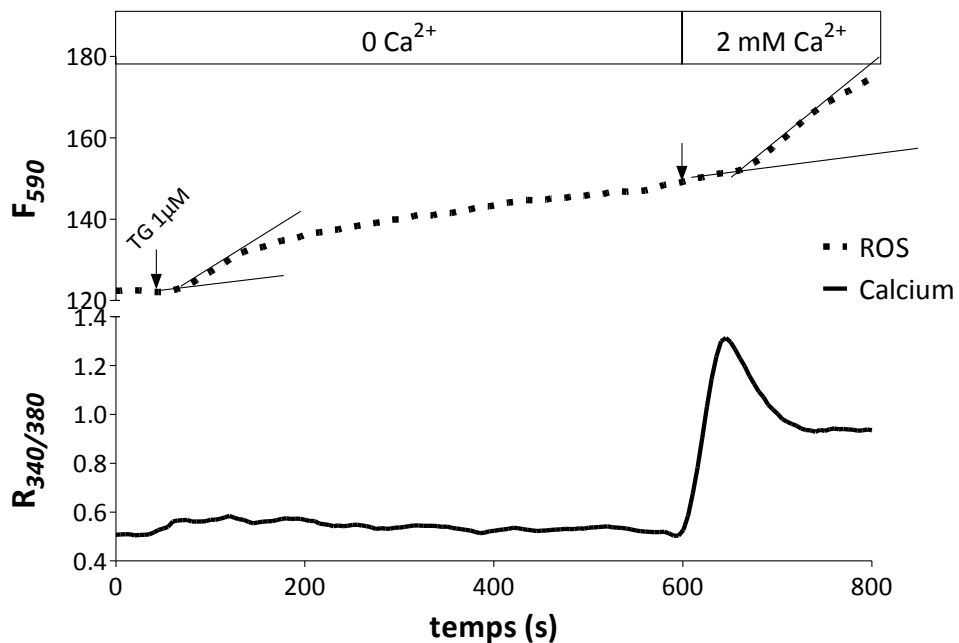


Figure 80. Mesure simultanée de la $[Ca^{2+}]_{cyt}$ et la production de FRO par les cellules PLB-985 différenciées traitées avec la TG. La figure représente une expérience

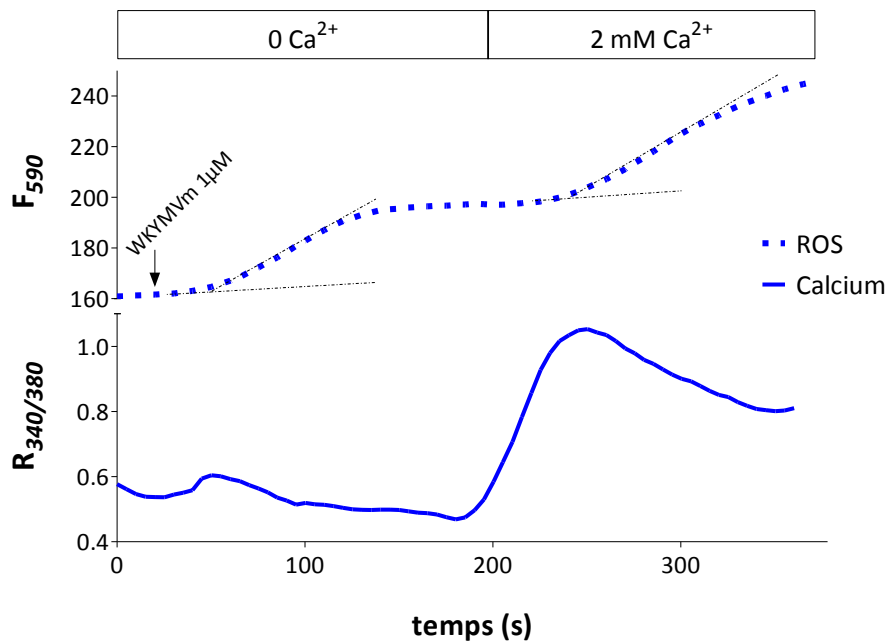


Figure 81. Mesure simultanée de la $[Ca^{2+}]_{cyt}$ et la production de FRO par les cellules PLB-985 différenciées stimulées avec le WKYMVm. La figure représente une expérience

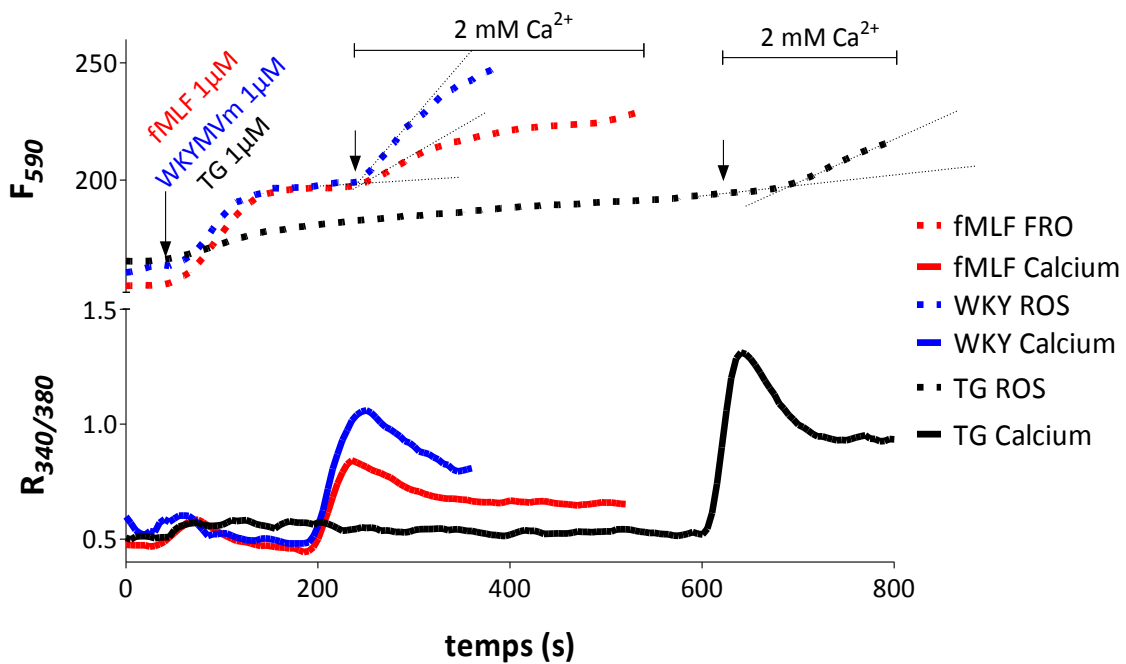


Figure 82. Récapitulatif des mesures simultanées des $[Ca^{2+}]_{cyt}$ et de la production de FRO suite aux diverses stimulations

On constate que la production de FRO survient ($44,5 \pm 2,5$ s, $n=2$) après l'augmentation transitoire de la $[Ca^{2+}]_{cyt}$ suite à la stimulation au fMLF et WKYMVm. En absence du Ca^{2+} extracellulaire, les cellules traitées avec la TG ne produisent pas de FRO. En revanche, lors d'une stimulation avec le fMLF et le WKYMVm à la concentration de $1\mu M$, les cellules produisent de FRO détectables avec l'Amplex UltraRed (pente $dF/dt = 0,30 s^{-1}$).

Lorsque le Ca^{2+} extracellulaire est ajouté au milieu, la production de FRO augmente de façon plus importante dans les cellules préalablement stimulées avec le WKYMVm (pente = $0,45$) qu'avec les cellules stimulées avec le fMLF ($dF/dt = 0,19 s^{-1}$). Enfin, l'ajout du $CaCl_2$ aux cellules prétraitées avec la TG $1\mu M$ génère une faible production de FRO (pente = $0,15 s^{-1}$) (**figure 82**).

XXVIII. DESENSIBILISATION DES RECEPTEURS FPR

Des études précédentes dans la littérature ont montré le phénomène de désensibilisation des récepteurs FPR par le WKYMVm. Le but est de confirmer ces résultats dans notre modèle de PLB-985. Pour cela les cellules PLB-985 différenciées ont été stimulées en absence de Ca^{2+} extracellulaire de façon alternative avec le fMLF $1\mu M$ ou WKYMVm $1\mu M$.

En absence de Ca^{2+} extracellulaire, lors de la stimulation des cellules avec le WKYMVm $1\mu M$, une augmentation transitoire des $[Ca^{2+}]_{cyt}$ est observée suite à la libération des ions Ca^{2+} à partir du RE, elle atteint un pic à ($R_{405/485} = 1,27 \pm 0,08$, $n=4$) après ($9,16 \pm 1,56s$, $n=4$) par rapport au niveau de base ($R_{405/485} = 0,59 \pm 0,01$, $n=4$). Une deuxième stimulation avec le fMLF $1\mu M$ ne produit aucun effet.

En revanche, lorsque les cellules ont été stimulées tout d'abord avec le fMLF $1\mu M$, une augmentation rapide et transitoire de $[Ca^{2+}]_{cyt}$ qui atteint un pic à ($R_{405/485} = 1,01 \pm$

0,08, n=4) après ($5,95 \pm 0,33s$, n=4) par rapport au niveau de base ($R_{405/485} = 0,53 \pm 0,02$, n=4). Une deuxième stimulation avec le WKYMVm 1 μ M produit une augmentation transitoire et rapide de la $[Ca^{2+}]_{cyt}$ avec une amplitude et en cinétique similaires à la première stimulation avec le fMLF ($R_{405/485} = 0,90 \pm 0,05$, n=4) après ($9,76 \pm 1,17s$, n=4)(**figure 83**). Ces résultats montrent un effet de désensibilisation des FPR par le WKYMVm ce qui supprime l'effet du fMLF sur ces récepteurs.

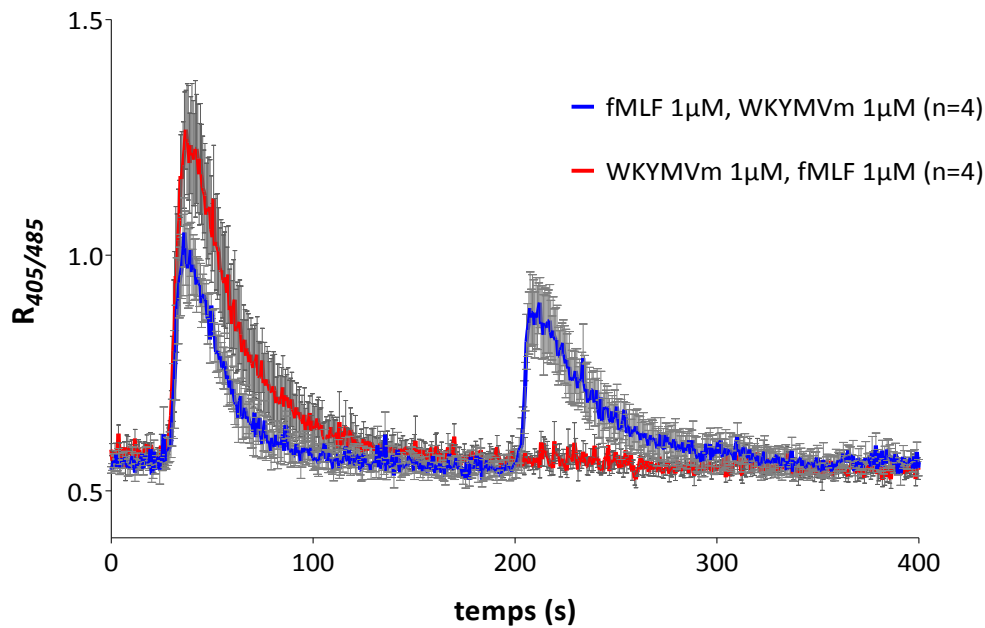


Figure 83. Le WKYMVm et non pas le fMLF désensibilise les FPR

XXIX. I_{SOC} DES PLB-985 DIFFERENCIÉES

Plusieurs équipes ont essayé d'identifier I_{CRAC} dans les neutrophiles comme l'équipe du Pr. Karl Heinz Krause à l'université de Genève. Heiner *et al* ont publié une trace du courant obtenu dans les cellules HL-60 qu'ils ont décrit comme proche de I_{CRAC} , il a été induit par une déplétion des réserves calciques avec l'InsP₃ (Heiner *et al.*, 2003). Dans le but d'identifier et de caractériser I_{SOC} dans les cellules PLB-985 différenciées, nous avons appliqué en configuration cellule-entière un protocole de voltage-clamp

de 0 à -100 mV pendant 100 ms, nous avons pu détecter un courant calcique I_{SOC} induit par une déplétion des réserves en Ca^{2+} avec le BAPTA 10 mM. Ce courant est inhibé par 1 μM de Gd^{3+} . La trace du courant est représentée en **figure 84**. Cette trace est parmi les rares traces qu'on a pu enregistrer en raison surtout des problèmes de fuite du courant. Par conséquent, ce résultats n'était pas productible et ça ne nous a pas permis une caractérisation complète de I_{SOC} .

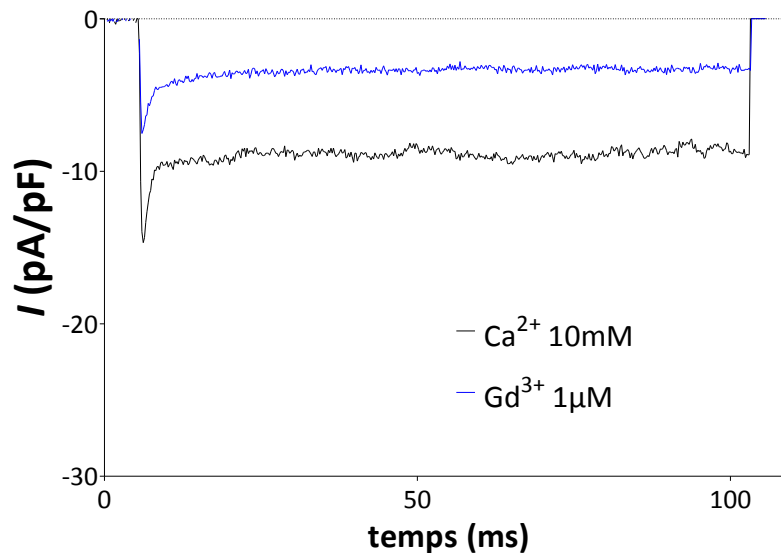


Figure 84. Une trace de courant I_{SOC} enregistrée dans les cellules PLB-985 différenciées

DISCUSSION

DISCUSSION

Dans les neutrophiles, le SOCE est le mécanisme majeur d'entrée de Ca^{2+} . Il contrôle plusieurs fonctions principales comme l'expression génétique (**Parekh et Putney, 2005**), la production de FRO (**Steinckwich et al., 2007**), la dégranulation (**Kankaanranta et al., 1995**). Quelques études ont été menées pour comprendre le mécanisme du SOCE dans les neutrophiles et caractériser les composants moléculaires essentiels.

Depuis très longtemps, les canaux TRP sont considérés comme des candidats potentiels pour formation du SOCE (**Heiner et al., 2003**). Dans les neutrophiles, la présence de canaux de la famille des TRPC : TRPC1, TRPC3, TRPC4 et TRPC6 et leurs implication dans le SOCE ont été montrées (**Brechard et al., 2008**).

Après la découverte de STIM et Orai comme des constituants majeurs de l'influx SOCE (**Zhang et al., 2005, Liou et al., 2005, Roos, 2005, Vig, 2006, Lis et al., 2007**), ils ont été montré comme indispensables à l'influx SOCE dans les neutrophiles (**Steinckwich et al., 2011**). Par ailleurs, Orai1 avec TRPC1 et TRPC6 forment le SOCE des neutrophiles alors que TRPC3 est responsable de l'influx indépendant du SOCE (**Brechard et al., 2008**). Le rôle de STIM1 dans l'influx SOCE et son implication dans l'activité de la NADPH oxydase ont été également démontrés (**Brechard et al., 2009, Steinckwich et al., 2011**).

Le rôle du SOCE dans les neutrophiles a été également démontré par l'utilisation des inhibiteurs du SOCE (**Sandoval et al., 2007**). Parmi ces inhibiteurs, le BTP2 (**Zitt et al., 2004**) qui inhibe la production de FRO induite par le fMLF sans modifier la phagocytose (**Steinckwich et al., 2007**).

Le 2-APB est un des outils de caractérisation du SOCE le plus largement utilisé. Il est considéré comme un puissant inhibiteur du SOCE dans plusieurs types cellulaires

(Dehaven *et al.*, 2008). La particularité du 2-APB est sa capacité de potentialiser et d'inhiber l'influx SOCE à différentes concentrations (Prakriya et Lewis, 2001).

Plusieurs études ont montré que le 2-APB possède des effets complexes sur I_{CRAC} induit lorsque Orai1, Orai2 ou Orai3 sont co-exprimés avec STIM1 dans les cellules HEK293 (Lis *et al.*, 2007). En effet, bien que le 2-APB à 50 μ M inhibe I_{CRAC} dans les cellules surexprimant Orai1-STIM1 ou Orai2-STIM2, il n'inhibe pas I_{CRAC} dans les cellules surexprimant Orai3-STIM1 mais en revanche le 2-APB à 30 μ M potentialise I_{CRAC} (Lis *et al.*, 2007). Dans les cellules HEK293, lorsque Orai1 est surexprimé avec STIM2, I_{CRAC} est largement potentialisé de manière transitoire par le 2-APB à 50 μ M (Parvez *et al.*, 2008). Le 2-APB à 50 μ M affecte STIM1 et la formation de puncta après une déplétion des réserves du RE par la TG, ce qui pourrait être en partie la cause de l'effet inhibiteur du 2-APB sur I_{CRAC} (Peinelt *et al.*, 2008). En revanche, la co-expression de Orai1 et STIM1 dans les cellules HEK293 diminue la capacité du 2-APB d'inverser la formation de puncta (Dehaven *et al.*, 2008).

L'équipe de Mikoshiba a décrit deux nouveaux analogues du 2-APB, DPB-162-AE et DPB-163-AE (voir figure 15, chapitre INTRODUCTION). Dans des cellules co-exprimant Orai1 et STIM1, ces analogues exercent de forts effets inhibiteurs du I_{CRAC} avec des IC_{50} de 86 ± 21 nM et 170 ± 68 nM pour DPB-162-AE et DPB-163-AE respectivement. Les auteurs de ce travail ont également montré que le DPB-162-AE prévient le réarrangement de STIM1 dans les puncta après une déplétion des réserves en Ca^{2+} dans le RE. Ce qui suggèrent que le DPB-162-AE affecte STIM1 plutôt que Orai1 (Goto *et al.*, 2010)

La molécule du 2-APB manque de spécificité. En effet, le début de l'histoire du 2-APB et son introduction en signalisation calcique a commencé en 1997 lorsque Maruyama *et al* ont découvert ses effets inhibiteurs sur les $InsP_3Rs$ (Maruyama *et al.*, 1997). Le 2-APB possède également des effets sur les pompes SERCA (Missiaen *et al.*, 2001) et des membres de la famille des canaux TRP comme TRPC1 (Delmas, 2002), TRPC3

(Ma *et al.*, 2000, Trebak *et al.*, 2002), TRPC5 (Lee *et al.*, 2003), TRPM2 (Togashi *et al.*, 2008), TRPV6 (Kovacs *et al.*, 2012, Voets *et al.*, 2001).

Dans le but d'améliorer la spécificité et l'efficacité du 2-APB afin de mieux caractériser le SOCE nous avons procédé dans la première partie de notre projet à étudier les effets des analogues du 2-APB sur le SOCE des cellules Jurkat des lymphocytes T. Ces analogues sont modifiés au niveau des deux phényles du 2-APB. Une étude de notre équipe a montré que le noyau BOC est une nécessité absolue à la potentialisation du SOCE par le 2-APB et que les phényles jouent un rôle plutôt dans l'inhibition. Les molécules qui ne possèdent pas un BOC complet ne potentialisent pas le SOCE comme le PBA qui contient un B(OH)₂, le DMBA avec un BOH ou le DP3A qui possède un noyau P-C-C à la place d'un B-O-C (**figure 84**) (Dellis *et al.*, 2011).

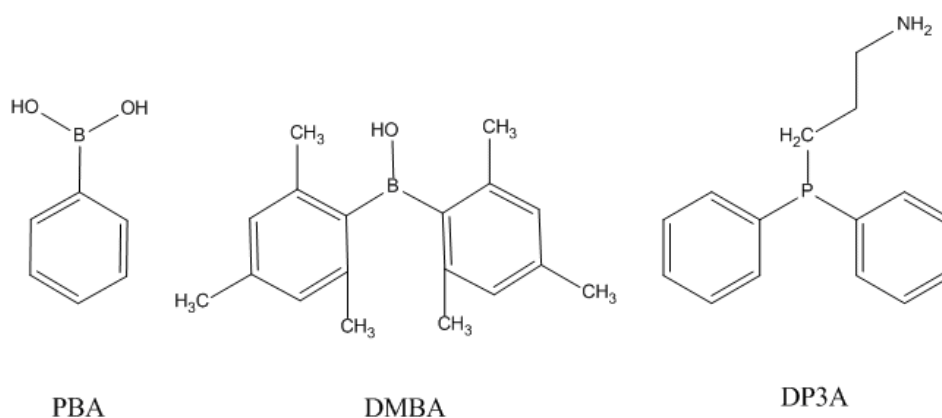


Figure 85. Structures des analogues du 2-APB, PBA, DMBA et DP3A

A partir de ces données nous avons cherché des molécules analogues du 2-APB qui contiennent un noyau BOC mais possèdent des changements au niveau de la structure des deux phényles. Dans ce travail, nous avons pu mettre en évidence des inhibiteurs du SOCE (Cyclic-APB et Benzothienyl-APB), un potentialisateur (MDEB)

et des composés avec une double activité potentialisation et inhibition du SOCE (Methoxy-APB, Dimethoxy-APB et Thienyl-APB).

XXX. EFFETS DES ANALOGUES DU 2-APB SUR LE SOCE

A. LE CYCLIC-APB INHIBE LE SOCE AVEC UNE IC_{50} DE 3 μ M

Le Cyclic-APB possède deux phényles liés par un pont (-CH₂-CH₂-) (voir figure 17, chapitre Matériel et Méthodes) formant ainsi un 3^{ème} cycle. Ce composé ne potentialise pas le SOCE des cellules Jurkat des lymphocytes T mais il l'inhibe avec une IC_{50} ~3 μ M.

L'effet du Cyclic-APB sur le SOCE des cellules Jurkat était comparable à l'effet du DMBA (figure 85), un autre analogue du 2-APB précédemment testé dans une autre étude (Dellis *et al.*, 2011).

L'absence de la potentialisation avec le Cyclic-APB malgré la présence de la composante BOC est peut être due à une non accessibilité du BOC à son site de potentialisation sur le SOC. Ainsi, le changement de la configuration spatiale de la molécule du 2-APB par l'introduction d'un nouveau cycle est peut être la cause de l'absence de la potentialisation.

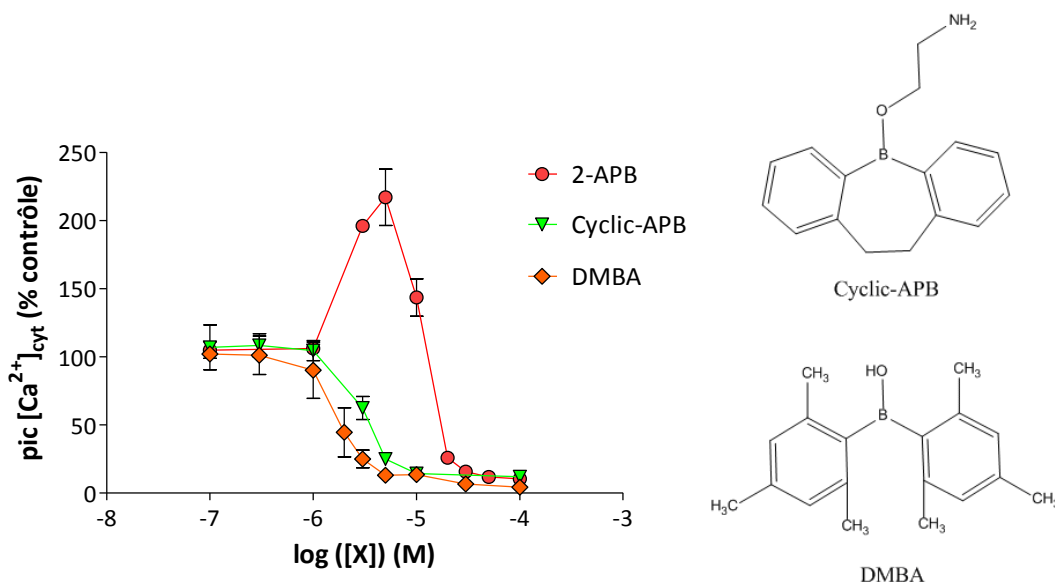


Figure 86. Effet similaire du Cyclic-APB et DMBA sur le SOCE des cellules T Jurkat

B. LE BENZOTHIENYL-APB EST UN PUISSANT INHIBITEUR DU SOCE AVEC UNE IC₅₀ DE 0,4 μM

L'absence de la potentialisation a également été retrouvée avec le Benzothienyl-APB, différent du 2-APB par le remplacement des deux phényles par deux Benzothienyl (voir figure 17, chapitre Matériel et Méthodes). Par ailleurs, nous avons constaté une forte inhibition du SOCE des cellules Jurkat des lymphocytes T avec un IC₅₀ de l'ordre de 0,4 μM.

L'effet du Benzothienyl-APB le place parmi les plus puissants inhibiteurs du SOCE qui existent actuellement sur le marché. L'absence de la potentialisation malgré la présence du BOC est peut être due à la taille des deux groupements benzothienyls qui empêchent l'accès du BOC à son site de potentialisation.

Une autre hypothèse est que la potentialisation du SOCE par le Benzothienyl-APB est masquée par un fort effet inhibiteur exercé par les deux gros groupements benzothienyls. Enfin, l'atome du soufre pourrait renforcer l'effet inhibiteur sur le canal SOC.

C. DOUBLE ACTIVITE DU THIENYL-APB SUR LE SOCE

Le Thienyl-APB possède deux groupements thienyls à la place des deux phényles (voir figure 17, chapitre Matériel et Méthodes). Il potentialise et inhibe le SOCE des cellules Jurkat mais avec une plus faible affinité et un shift de l'ordre de 10 par rapport au 2-APB.

Cette molécule avait un effet comparable au 2-ABB sur le SOCE des cellules Jurkat (figure 86). Le 2-ABB potentialise et inhibe le SOCE mais avec une moindre affinité par rapport au 2-APB (Dellis *et al.*, 2011).

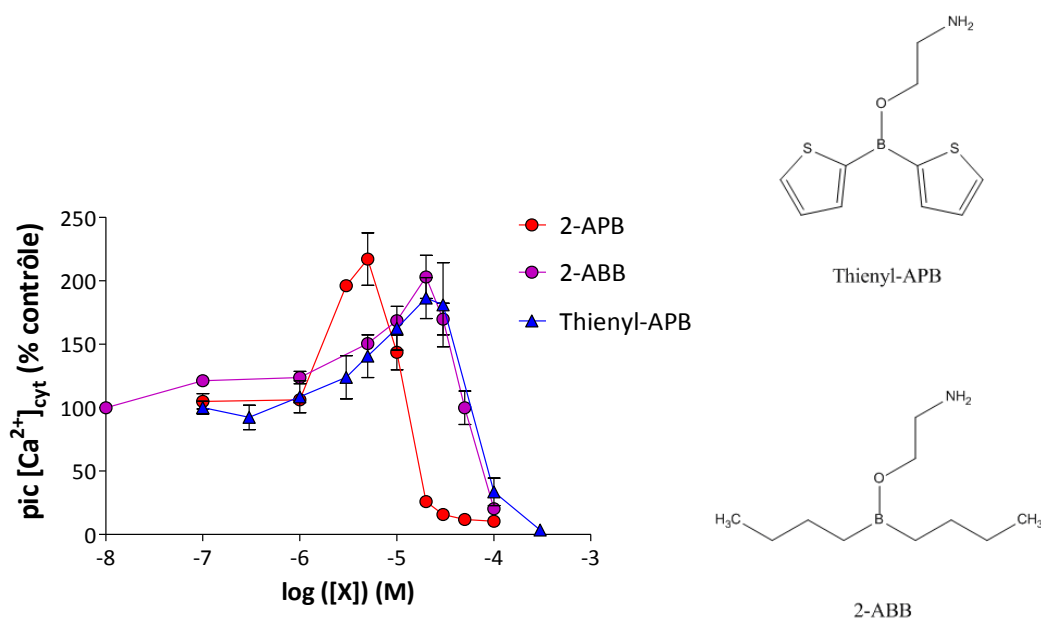


Figure 87. Effet similaire du Benzothiényl-APB et 2-ABB sur le SOCE des cellules T Jurkat

La potentialisation du SOCE par le Thiényl-APB est due à la présence du BOC dans sa structure. Egalement, les deux groupements thiényls sont de taille similaire par rapport aux deux phényles ce qui n'empêche pas le BOC d'accéder à son site de potentialisation sur le SOC.

D. METHOXY-APB ET DIMETHOXY-APB POTENTIALISENT MOINS LE SOCE

Le Methoxy-APB et le Dimethoxy-APB possèdent dans leurs structures un (-OCH₃) et 2 x (-CH₃) respectivement (voir figure 17, chapitre Matériel et Méthodes). Ces deux molécules potentialisent le SOCE mais avec une faible intensité par rapport au 2-APB. Ceci est probablement dû à l'effet déstabilisant des groupements methoxy sur le BOC baissant ainsi la potentialisation du SOCE initialement observée avec le 2-APB.

E. MDEB UN POTENTIALISANT DU SOCE

Le MDEB qui contient un BOC mais pas de phényles (voir figure 17, chapitre Matériel et Méthodes) potentialise fortement le SOCE mais à des concentrations beaucoup plus élevées que le 2-APB. Malgré son manque d'affinité, le MDEB est une molécule très intéressante car elle potentialise le SOCE sans l'inhiber même à de très fortes doses.

XXXI. EFFETS DES ANALOGUES DU 2-APB SUR LES InsP_3Rs

Sachant que le 2-APB est un inhibiteur des InsP_3Rs , nous avons étudié les effets de ses analogues sur ces récepteurs. A l'exception du MDEB, tous les analogues étudiés ont inhibé la libération du Ca^{2+} à partir du RE en inhibant les InsP_3Rs .

Le Methoxy-APB, le Dimethoxy-APB, le Cyclic-APB, le Thienyl-APB et le Benzothienyl-APB ne sont pas spécifiques du SOCE car ces molécules inhibent en plus les InsP_3Rs . En revanche, le MDEB n'affecte pas la libération du Ca^{2+} à partir du RE par les InsP_3Rs , et il est plus spécifique du SOCE.

XXXII. MDEB POTENTIALISE LE I_{CRAC}

Le SOCE est le mécanisme d'influx majeur chez les lymphocytes caractérisé par I_{CRAC} . Nous voulions confirmer l'effet du MDEB sur l'augmentation de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ en patch-clamp en mesurant en configuration cellule-entière le I_{CRAC} . Nous avons pu mettre en évidence une potentialisation par le MDEB de l'amplitude du I_{CRAC} dans les cellules Jurkat dont le SOCE a été induit par deux chélateurs de Ca^{2+} , l'EGTA et le BAPTA.

Plusieurs études ont montré que le Ca^{2+} intracellulaire inhibe le I_{CRAC} en deux manières différentes. Une phase lente qui se produit dans des dizaines de secondes, un processus qui se produit en partie suite au remplissage des réserves en Ca^{2+} (Zweifach et Lewis, 1995a, Hoth et Penner, 1993, Zweifach et Lewis, 1995b). Et une

phase rapide d'inactivation due au Ca^{2+} qui inactive I_{CRAC} en quelques millisecondes suivant l'application des voltages hyperpolarisant (**Hoth et Penner, 1992, Hoth et Penner, 1993**). Il a été montré que le 2-APB à faibles concentrations accélère l'inactivation rapide due au Ca^{2+} en parallèle à une augmentation de l'amplitude du I_{CRAC} . Le 2-APB à fortes concentrations (40 μM) induit une augmentation transitoire de l'amplitude de I_{CRAC} puis une inhibition complète. Cette inhibition de I_{CRAC} est également associée à une suppression de l'inactivation rapide (**Prakriya et Lewis, 2001**).

Dans notre étude et en calculant les constantes d'inactivation rapide, nous avons montré qu'à la différence du 2-APB, le MDEB à 1 mM diminue l'inactivation rapide tout en gardant la potentialisation de I_{CRAC} .

XXXIII. ANALOGUES DU 2-APB ET SYNTHÈSE DE L'IL-2

Les effets des analogues du 2-APB sur un des marqueurs de la prolifération lymphocytaire T qui est la synthèse de l'IL-2 stimulée par la PHA, montrent un effet inhibiteur de tous ces analogues.

Le Cyclic-APB et le Benzothienyl-APB ont été utilisés à des concentrations de 10 μM qui inhibent à la fois du SOCE et des InsP_3Rs . L'inhibition de la synthèse de l'IL-2 observée avec le traitement des cellules avec les inhibiteurs du SOCE (le Cyclic-APB, le Benzothienyl-APB) est justifiée vue que le processus de la production de cytokine est Ca^{2+} -dépendant et qu'il a été montré également que des antagonistes des InsP_3Rs inhibe fortement la production de l'IL-2 (**Dadsetan et al., 2008**).

En revanche, l'effet le plus surprenant était celui du MDEB avec lequel on s'attendait à une augmentation de la production de l'IL-2 car c'est un potentialisateur du SOCE. Ce composé inhibait également la synthèse de l'IL-2 dans les cellules Jurkat stimulées avec la PHA.

Nous nous sommes posés la question si cet effet inhibiteur sur la synthèse de l'IL-2 n'est pas dû à une toxicité cellulaire par une surcharge en Ca^{2+} . Les expériences de l'apoptose ont montré que le MDEB induit une mort des cellules Jurkat lorsqu'elles sont stimulées avec la PHA. Compte tenu de ces résultats, l'effet inhibiteur du MDEB sur la synthèse de l'IL-2 est probablement dû à une apoptose des cellules Jurkat suite à une surcharge calcique.

XXXIV. INFLUX SOCE DES PLB-985

La première étape de caractérisation de l'effet des analogues du 2-APB dans les cellules Jurkat nous a permis d'isoler deux molécules potentiellement intéressantes, le Benzothienyl-APB et le MDEB. La première molécule car elle est uniquement inhibitrice du SOCE avec une IC_{50} intéressante de 0,4 μM et la deuxième molécule car c'est le seul produit uniquement potentialisant du SOCE qui existe sur le marché.

L'activation physiologique du SOCE lors d'une stimulation des FPR par le fMLF (**Montero et al., 1991**) a été également étudiée. Dans notre modèle de cellules PLB-985, contrairement au SOCE induit par la TG, l'augmentation de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ est faible après une stimulation au fMLF en comparaison avec les cellules de la lignée HL-60 différenciées (**Zou et al., 2012**). En revanche, cette augmentation de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ est similaire en intensité à celle enregistrée avec les neutrophiles humains (**Salmon et Ahluwalia, 2010b**).

Nous nous sommes intéressés à comprendre le faible influx apparent du Ca^{2+} suite à une stimulation avec le fMLF par rapport à une stimulation avec le WKYMVm ou une déplétion du RE avec la TG. Pour cela, nous nous sommes focalisés sur la composante influx en étudiant l'influx du Ba^{2+} et du Mn^{2+} qui ne sont pas extrudés de la cellule. Après une stimulation au fMLF, l'influx du Ba^{2+} était similaire à celui obtenu après stimulation avec le WKYMVm et la TG. De même, suite à une

stimulation des cellules par le fMLF, nous avons constaté un influx du Mn^{2+} important.

Ces résultats confirment une entrée des cations divalents suite à une stimulation au fMLF similaire à celle stimulée par le WKYMVM ou la TG. Ce qui suppose un effet similaire sur influx du Ca^{2+} stimulé par le fMLF mais qui est opposé par un fort efflux.

Quelques études ont montré que le fMLF exerce en partie un effet inhibiteur transitoire de l'influx de Ca^{2+} qui est supposé due à une activation de la protéine kinase C (PKC), un des régulateurs du SOCE (Montero *et al.*, 1993b, Montero *et al.*, 1993a, Lee *et al.*, 1997) ou par un effet activateur de la PKC sur les PMCA (Smallwood *et al.*, 1988). L'activation des PMCA augmente l'efflux du Ca^{2+} et peut expliquer la faible augmentation de la $[Ca^{2+}]_{cyt}$ apparente que nous avons observé qui n'est en réalité que le résultat entre un influx de Ca^{2+} et un efflux important qui s'y oppose.

Peut être il serait intéressant d'étudier l'influx du Ca^{2+} suite à une stimulation avec le fMLF en inhibant l'efflux du Ca^{2+} par des inhibiteurs sélectifs des pompes PMCA comme la carboxyeosine ou la famille des caloxines.

A.EFFETS DES ANALOGUES DU 2-APB SUR LE SOCE DES PLB-985

La courbe dose-réponse de l'effet du 2-APB sur le SOCE induit par la TG a démontré la double activité du 2-APB avec une potentialisation à faibles doses et une inhibition à partir de fortes doses. Cette CDR était similaire à celle obtenu dans les cellules Jurkat. Ceci confirme l'existence d'un influx SOCE modulable par le 2-APB chez les PLB-985 différenciées similaire à celui des cellules Jurkat.

L'effet des analogues du 2-APB sur l'influx SOCE induit par la TG et le fMLF a été étudié et nous avons montré que le MDEB à 1 mM augmente l'amplitude de l'influx

qui est plus soutenu dans le temps. A l'inverse, le Benzothienyl-APB à 10 μM inhibe fortement l'influx induit par la TG, un effet qui est comparable à l'effet obtenu avec le SKF-96365 à 30 μM .

Nous avons étudié l'effet des analogues du 2-APB sur l'entrée du Mn^{2+} , suite à la stimulation par le fMLF et le WKYMVm, nous avons montré que le Benzothienyl-APB à 10 μM inhibe totalement l'influx du Manganèse, en revanche, le MDEB le potentialise. Ces résultats confirment encore l'effet de ces analogues sur l'influx des cations divalents.

B. EFFETS DU Ca^{2+} SUR LA PHAGOCYTOSE DES LEVURES

Après une caractérisation des effets du Benzothienyl-APB et du MDEB sur l'influx SOCE des PLB-985 différenciées, nous nous sommes ensuite intéressés à l'implication du SOCE dans les activités des neutrophiles en utilisant comme outils pharmacologiques le Benzothienyl-APB et le MDEB.

Nos résultats montrent que le pourcentage des cellules PLB-985 qui phagocytent les levures opsonisées avec le sérum humain complet contenant les IgG et le complément n'est pas modifié en présence ou en absence du Ca^{2+} extracellulaire. Ceci est en accord avec une étude dans les macrophages péritonéaux de souris qui montrent que la chélation du Ca^{2+} extracellulaire par l'EGTA est sans conséquence sur la phagocytose des grains opsonisés avec des IgG. En revanche, la chélation à la fois du Ca^{2+} extracellulaire et intracellulaire réduit de 30 % la phagocytose (Hishikawa *et al.*, 1991).

Par ailleurs, une étude similaire a montré que dans un milieu sans calcium extracellulaire et par chélation du calcium intracellulaire avec l'EGTA 0,2 mM, la phagocytose des érythrocytes opsonisés avec les IgG par les macrophages péritonéaux de souris et des macrophages de la lignée J774, est réduite de 40% (Young *et al.*, 1984).

Dans les neutrophiles humains, **Lew et al.**, ont montré par l'utilisation de la sonde fluorescente Quin-2 comme chélateur du Ca^{2+} , que la phagocytose est régulée par deux voies distinctes, une voie Ca^{2+} -dépendante liée aux récepteurs Fc et une autre voie indépendante du Ca^{2+} initiée par les récepteurs au complément C3b/bI (**Lew et al., 1985**). En revanche, McNeil et al., n'ont pas constaté de changement dans la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ au cours de la phagocytose des érythrocytes opsonisés avec les IgG par les macrophages péritonéaux de souris (**Mcneil et al., 1986**).

Cette étude est confirmée ensuite par des travaux qui montrent que les variations de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ ne sont pas indispensable pour que la phagocytose se produise. Et ils ont montré que la phagocytose médiée par le FcR se produit normalement même en présence de très faibles $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ (1-10 nM). Ceci a été réalisé par utilisation des chélateurs comme l'EGTA ou le Quin-2 dans les cellules de la lignée de macrophages J774 (**Di Virgilio et al., 1988**). De même, l'assemblage et le désassemblage des filaments d'actine dans des macrophages de souris au cours de la phagocytose médiée par le récepteur Fc ne sont pas modifiés lors de la chélation du Ca^{2+} extra et intracellulaire (**Greenberg et al., 1991**). Dans des neutrophiles humains, il a été montré qu'en absence du Ca^{2+} extracellulaire et en chélatant le Ca^{2+} intracellulaire, l'ingestion des levures opsonisées avec les IgG est similaire à celle observée avec les neutrophiles non traités par le chélateur. Une faible baisse du taux de phagocytose est observée dans les particules de levures opsonisées avec le C3b/bI (**Della Bianca et al., 1990**).

Le traitement des cellules neutrophiles avec le BTP2 à 10 μM , un inhibiteur du SOCE n'avait pas d'effet sur la phagocytose des particules de zymosan ou *E.coli* (**Steinckwich et al., 2007**). Dans les HL-60, il a été montré que la déplétion des réserves du RE en Ca^{2+} par un traitement des cellules avec la TG ou par chélation du Ca^{2+} intracellulaire avec le BAPTA, que la phagocytose des particules du zymosan induite par les $\text{Fc}\gamma\text{R}$ n'est pas modifiée. De plus, la phagocytose des particules du

zymosan est insensible à l'absence du Ca^{2+} extracellulaire ou par un traitement des cellules par le lanthane (Steinckwich *et al.*, 2011).

Le rôle de STIM1 dans la signalisation *via* les $\text{Fc}\gamma\text{R}$ a été montré dans les macrophages de souris (Braun *et al.*, 2009). Récemment il a été montré que STIM1 est recruté à proximité de la membrane du phagosome et qu'elle induit l'ouverture des SOC à la membrane des phagosomes permettant la libération locale du Ca^{2+} nécessaire au cours du processus de la phagocytose (Nunes *et al.*, 2012).

En conclusion, le rôle du Ca^{2+} extracellulaire dans le processus phagocytaire reste controversé et il est plus complexe dans la mesure où ces études ont été réalisées dans des types cellulaires différents.

C. EFFETS DES ANALOGUES DU 2-APB SUR LA PHAGOCYTOSE DES LEVURES

Dans une étude récente, il a été montré que le 2-APB n'altère pas la phagocytose des bactéries *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* par des neutrophiles bovins (Conejeros *et al.*, 2012b). Dans notre modèle de cellules PLB-985, le 2-APB à faibles concentrations (5 μM) et à fortes concentrations (100 μM) avait un effet inhibiteur de la phagocytose. De même, les analogues du 2-APB utilisés dans cette étude le MDEB à 1 mM et Benzothienyl-APB à 10 μM inhibaient également la phagocytose. Si l'inhibition de la phagocytose par les inhibiteurs classiques du SOCE comme le SKF-96365 ou le 2-APB 100 μM est justifiée, ce n'est pas le cas pour le 2-APB à 5 μM ou le MDEB à 1 mM deux puissants agents potentialisateurs du SOCE. Une des explications est que la plupart des équipes n'ont pas pu mettre en évidence un rôle clair d'une augmentation de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ dans le processus phagocytaire, par conséquent une augmentation d'influx du Ca^{2+} avec ces produits n'est peut être pas nécessaire à potentialiser la phagocytose.

Enfin, l'absence de l'effet potentialisateur du MDEB et du 2-APB sur la phagocytose des levures est peut être liée à la nature chimique des analogues le MDEB et le

Benzothienyl-APB qui sont des composés instables en solution aqueuse à température 37°C et pendant 1 heure d'incubation (**Chudzinski et al., 2011**). Sachant que le protocole suivi pour mesurer la phagocytose et la production de FRO intraphagosomales est réalisé dans des conditions similaires avec une incubation des cellules et des produits analogues pendant 45 min à température 37°C.

Il est probable dans ces conditions que les esters de bore s'hydrolyse et libèrent leurs acides qui sont dépourvus d'activité sur la potentialisation car ils ont perdu l'intégrité du BOC. Alors qu'ils pourraient être des inhibiteurs du SOCE comme le DMBA.

D. EFFETS DU Ca^{2+} SUR LA PRODUCTION DE FRO INTRAPHAGOSOMALES

Nos résultats ne montrent pas de différence sur le pourcentage des FRO produites à l'intérieur du phagosome entre un traitement en présence du Ca^{2+} ou en absence du Ca^{2+} . Dans des neutrophiles humains, il a été montré que le fait d'enlever le Ca^{2+} extracellulaire du milieu et de chélater le Ca^{2+} intracellulaire, la production de FRO a été diminué uniquement de 30% au cours de la phagocytose des particules de levures (**Della Bianca et al., 1990**). En revanche, en absence du Ca^{2+} extracellulaire, la production de FRO intraphagosomales est réduite d'environ 50% dans les cellules HL-60 différenciées. Une inhibition d'environ 50% est également observée lorsque les cellules ont été traitées avec le lanthane en présence du Ca^{2+} extracellulaire. Enfin, lorsque l'expression de STIM1 et Orai1 est éteinte (avec une réduction d'environ 70% l'expression de l'ARNm et environ 60% l'expression protéique), la production de FRO intraphagosomales est réduite de 54% et 37% respectivement (**Steinckwich et al., 2011**).

Le traitement des cellules PLB-985 avec les analogues du 2-APB inhibiteurs du SOCE (Benzothienyl-APB 10 μM et 2-APB 100 μM) inhibe fortement la production de FRO

intraphagosomales. En revanche, on constate une forte inhibition de la production de FRO avec le 2-APB à 5 μ M et une faible baisse inhibition avec le MDEB à 1 mM.

Il a été montré que le traitement de neutrophiles humains avec 10 μ M de BTP2, un inhibiteur de SOCE n'a pas affecté la production intraphagosomales de FRO (Steinckwich *et al.*, 2007).

E. EFFETS DU BENZOTHIENYL-APB ET MDEB SUR LA PRODUCTION DE FRO EXTRA ET INTRACELLULAIRES

Dans nos résultats nous avons montré qu'à l'inverse des FRO intraphagosomales induites par les FcR et C3b/bI, les FRO extracellulaires et intracellulaires produites suite à une stimulation par le fMLF sont sensibles au Ca^{2+} extracellulaire.

La stimulation des neutrophiles avec les peptides chimiotactiques comme le fMLF induit une mobilisation du Ca^{2+} à partir du RE et une augmentation transitoire de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ dans un premier temps puis l'influx des ions Ca^{2+} ajoutés au milieu extracellulaire (Montero *et al.*, 1991, Demaurex *et al.*, 1994).

Nos résultats confirment les travaux de Geiszt *et al.* Après chélation du Ca^{2+} extracellulaire avec l'EGTA, le Ca^{2+} contenu dans les réserves intracellulaires est capable à lui seul d'induire une production de FRO mais d'une intensité plus faible en absence du Ca^{2+} extracellulaire et avec une cinétique de retour au basal plus rapide également (Geiszt *et al.*, 1999, Bei *et al.*, 1998).

Le traitement des cellules PLB-985 avec le 2-APB à 5 μ M en présence ou en absence du Ca^{2+} réduit très fortement la production de FRO sans la supprimer ceci est probablement dû à l'effet du 2-APB sur les InsP_3Rs . Le 2-APB à 5 μ M inhibe partiellement la libération du Ca^{2+} à partir du RE.

Lorsque les cellules ont été traitées avec le 2-APB à 100 μM , il y a une suppression totale de la production de FRO car avec cette concentration, les InsP_3Rs ainsi que le SOCE sont inhibés.

Dans les neutrophiles humains, il a été observé que le SKF-96365 à 10 μM n'avait pas d'effet sur la libération du Ca^{2+} à partir du RE suite à une stimulation avec le fMLF. Mais une inhibition est observée à de fortes concentration (une inhibition d'environ 10% avec 30 μM SKF-96365) (Merritt *et al.*, 1990). Dans nos résultats, le SKF-96365 à 30 μM inhibe partiellement la libération de Ca^{2+} à partir du RE, ceci explique son effet sur la production de FRO. En revanche l'effet inhibiteur du SKF-96365 sur la production de FRO est moins prononcé en présence du Ca^{2+} car le SKF-96365 n'inhibe pas complètement l'influx SOCE suite à une stimulation avec le fMLF.

Le Benzothienyl-APB à la concentration de 10 μM supprime la production des FRO à la fois en présence et en absence du Ca^{2+} extracellulaire, ceci est justifié car le Benzothienyl-APB 10 μM inhibent à la fois la libération du Ca^{2+} à partir du RE et l'influx SOCE.

Enfin, nos tentatives pour étudier l'effet du MDEB sur la production de FRO extra et intracellulaires ont toutes échouées car malheureusement ce produit interfère avec nos modes de détection des FRO qu'on dispose au laboratoire. L'interférence du MDEB a été observée avec les méthodes de mesure de FRO par chimioluminescence du luminol et la spectrofluorimétrie avec l'Amplex Ultra-Red malgré l'ajout du MDEB dans une solution ne contenant pas de cellules.

Le PMA stimule la production des FRO indépendamment du Ca^{2+} (Khalfi *et al.*, 1996). Nous n'avons pas constaté de différences dans la production de FRO entre les cellules en présence de Ca^{2+} extracellulaire ou non.

Afin d'étudier la réactivité de nos analogues du 2-APB avec les FRO produites par les PLB-985 (*effet scavenger*) indépendamment de leurs rôles dans la signalisation

calcique. Nous avons traité les cellules PLB-985 avec le PMA et quand le plateau de la production de FRO est atteint, les produits analogues du 2-APB sont ajoutés.

Le composé 2-APB à 100 μM supprime totalement les FRO produites par les cellules. En revanche, le 2-APB 5 μM n'avaient qu'un faible effet. Le Benzothienyl-APB à 10 μM à l'inverse du 2-APB 100 μM supprime de façon lente les FRO produites par une stimulation des cellules par le PMA. Un des avantages du Benzothienyl-APB sur la molécule du 2-APB est sa faible réactivité avec les FRO formées, ce qui pourrait faire de ce composé un meilleur outil pour inhiber les FRO dans les cellules phagocytaires.

Le MDEB possède lui aussi un fort effet scavenger des FRO. Ceci pose un problème dans la mesure où il est active à de fortes concentrations de l'ordre du millimolaire.

Puisque le MDEB interfère avec les méthodes de détection de FRO pratiquées au laboratoire, cela nous empêche d'étudier ses effets fonctionnels Ca^{2+} -dépendant sur notre modèle de cellules PLB-985.

Quelques équipes ont étudié les effets du 2-APB sur la production de FRO parmi lesquelles une étude récente qui montre que le 2-APB inhibe fortement la production de FRO dans des neutrophiles bovins. Les auteurs de ce travail ont incubé pendant 15 minutes les cellules en présence du 2-APB avec des concentrations [0,1-5 μM] avec une inhibition presque totale de FRO avec 5 μM du 2-APB (Conejeros *et al.*, 2012a) ce qui nous fournit moins d'informations sur l'effet réel de ce produit. D'où la nécessité d'étudier en temps réel les effets des analogues.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Mes travaux de thèse ont permis de caractériser deux nouvelles molécules analogues du 2-APB, un fort potentialisateur le MDEB et un puissant inhibiteur du SOCE le Benzothienyl-APB.

MDEB

Le MDEB se distingue de toutes les molécules étudiées par son effet potentialisant du SOCE. Il est le seul composé uniquement potentialisant du SOCE qui existe actuellement sur le marché. Un autre avantage de ce composé est sa spécificité vis-à-vis le SOCE. Nous avons montré que ce composé n'affecte pas les InsP₃R et la libération du Ca²⁺ à partir du RE.

En revanche, le MDEB présente quelques inconvénients qui limiteront une éventuelle utilisation à des fins thérapeutiques. Premièrement, il possède une faible affinité. En effet, la potentialisation du SOCE atteint son maximum à des concentrations de l'ordre du millimolaire. Deuxièmement, le MDEB est instable en solution aqueuse d'où l'intérêt de collaborer avec des chimistes afin d'améliorer sa stabilité et son efficacité.

Parmi les effets potentiels du MDEB est sa capacité à induire l'apoptose. Cette caractéristique pourrait être intéressante dans le but de contrôler les maladies inflammatoires chroniques en induisant l'apoptose des cellules immunitaires suractivées. En cancérologie, également il serait intéressant afin de contrôler la prolifération des cellules tumorales. Mais avant cela, il est nécessaire d'améliorer à la fois sa stabilité et son affinité.

Dans cette étude, en utilisant le MDEB nous n'avons pas réussi à étudier les activités oxydatives Ca²⁺-dépendantes des PLB-985 à cause des problèmes d'interférence du MDEB avec les méthodes de détections de FRO comme la chimiluminescence, la

fluorescence de l'Amplex-Red. Nous avons également essayé d'étudier son effet sur la réduction du Cytochrome c, mais les FRO produites par les cellules PLB-985 différenciées n'étaient probablement pas suffisantes pour être détectées avec cette méthode.

THIENYL-APB

Le Thienyl-APB est un puissant inhibiteur du SOCE avec une IC_{50} de 0,4 μ M. C'est un des plus puissants inhibiteurs du SOCE disponible dans le commerce. Son activité est supérieure à celle du SKF-96365 qui est largement utilisé dans la caractérisation du SOCE (IC_{50} entre 1-4 μ M) (Demaurex *et al.*, 1992, Tornquist, 1993, Mason *et al.*, 1993). En plus de son activité intéressante sur le SOCE, le Benzothienyl-APB inhibe également les $InsP_3$ Rs comme le 2-APB.

Après cette caractérisation pharmacologique de nouveaux outils pour étudier le SOCE des leucocytes, il est nécessaire dans le futur d'identifier les canaux calciques présents dans les cellules PLB-985 différenciées comme les canaux Orai1, Orai2, Orai3, les membres de la famille des TRP ainsi que les senseurs du Ca^{2+} STIM1 et STIM2 par des techniques de PCR et western blot. Ensuite, étudier leurs rôles dans le SOCE des cellules PLB-985 en utilisant à la fois des siRNA et les analogues du 2-APB qu'on a pu caractérisés dans ce travail. Ces travaux vont nous permettre par la suite de comprendre le mécanisme d'action des analogues du 2-APB.

Le MDEB et le Thienyl-APB viennent s'ajouter à un arsenal d'outils pharmacologiques afin de bien comprendre les mécanismes moléculaires du SOCE, caractériser son rôle en physiopathologie cellulaire et développer des immunomodulateurs en thérapeutique.

La recherche de molécules inhibitrices du SOCE afin de contrôler les maladies inflammatoires chroniques est toujours d'actualité. Plusieurs entreprises pharmaceutiques se sont investies dans le développement d'inhibiteurs de SOCE

comme Abbot, Astella Pharma, Boehringer Ingelheim, Syntha Pharmaceuticals (Sweeney *et al.*, 2009).

CalciMedica une récente entreprise pharmaceutique développe une molécule prometteuse, le premier inhibiteur des canaux CRACs qui est actuellement en essai clinique de phase I pour le traitement de psoriasis, une maladie inflammatoire chronique.

ANNEXE

MANUSCRIT N°1

A. MANUSCRIT N°1

TITLE PAGE

Characterization of Novel Store Operated Calcium Entry Effectors

Alaeddine DJILLANI, Oliver Nüsse and Olivier DELLIS

Univ. Paris-Sud, Orsay, France and INSERM UMR-S 757, Orsay, France

ABBREVIATIONS

BOC, boron-oxygen core; $[Ca^{2+}]_{cyt.}$, cytosolic Ca^{2+} concentration; DRC, dose response curve; ER, endoplasmic reticulum; IP_3R , Inositol-1,4,5-trisphosphate Receptor; SOC, Store-Operated Channels; SOCE, Store-Operated Calcium Entry; TG, thapsigargin; PHA, phytohemagglutinin; STIM, Stromal Interaction Molecule.

ABSTRACT

2-aminoethyl diphenylborinate (2-APB) is a well known effector of the store-operated Ca^{2+} entry of leukocytes, with a dual effect: potentiation at 1-5 μM , inhibition at > 30 μM . Unfortunately, it is also able to modify the activity of other Ca^{2+} transporters, and thus, can not be used as a therapeutical tool to control the leukocyte activity in diseases like inflammation. Previously, we have shown that SOCE potentiation depends on the presence of the central boron-oxygen core (BOC) and that the phenyl groups determine the sensitivity of the molecule to inhibit and/or potentiate the SOCE.

We hypothesized that by modifying the two phenyl groups of 2-APB, we could identify more efficient analogues. Thus, addition of methoxyl groups to the same phenyl group greatly decreased the potentiation ability, without any significant effect on the inhibition'. Surprisingly, when the free rotation of the two phenyl groups was blocked by a new hydrocarbon bridge, the BOC was not functional. Furthermore, larger aryl groups than phenyl also impaired the activity of the BOC. Thus, the potentiation site in the Ca^{2+} channel is not accessible to the BOC when the lateral groups are too large or unable to freely rotate. However, these molecules are potent inhibitors of store operated calcium entry with affinities below 1 μM and they can block the activation of the Jurkat T cells.

Thus it is possible to find 2-APB analogues with different properties that could be the first step in the discovery of new immunomodulators.

INTRODUCTION

2-aminoethyl diphenylborinate (2-APB, compound 1, **Fig.1**) is a commonly used effector of the store-operated calcium entry (SOCE) of various cells. SOCE, which was characterized in mast cells and lymphocytes in the early 90's (**Hoth et Penner, 1992, Zweifach et Lewis, 1993**), is the main Ca^{2+} entry of leukocytes and is absolutely required for their activation. When a leukocyte is stimulated *via* a receptor, inositol-1,4,5-trisphosphate (IP_3) is often synthesized, diffuses in the cytosol and binds to its receptors (IP_3R) at the surface of the endoplasmic reticulum (ER), inducing their opening and the release of the Ca^{2+} ions trapped in the ER lumen. The decrease of the intraluminal Ca^{2+} concentration induces the oligomerisation of the ER transmembrane protein STIM1. Then oligomerised STIM1 proteins directly and physically interact with plasma membrane Orai1 proteins which form Ca^{2+} specific channels. This interaction allows the opening of the channels, and the massive entry of extracellular Ca^{2+} ions by the so-called Store-Operated Ca^{2+} Entry. Absence of functional STIM1 or Orai1 impairs the SOCE and the activation of leukocytes, and is responsible of severe combined immunodeficiencies (**Feske et al., 2010**).

Pharmacological compounds acting on Orai1/STIM1 proteins are theoretically interesting to control the activities of leukocytes, and thereby the activity of the immune system and could be useful to treat inflammation and auto-immune diseases for example. Thus, several laboratories have developed SOCE effectors, but none is already used for therapies, mainly due to a lack of specificity.

Despite its interesting activity on SOCE, 2-APB lacks specificity. Thus it was originally described as an IP_3R inhibitor (**Maruyama et al., 1997**), and was thereafter shown to block Ca^{2+} -ATPases of the endoplasmic reticulum (**Missiaen et al., 2001**) and some TRPC channels (**Lievremont et al., 2005**). It is also able to activate some others members of the TRPV channel family (**Hu et al., 2004**).

2-APB is a small molecule with three distinct parts: (i) a central boron-oxygen core (BOC), (ii) an ethanolamine chain and (iii) two phenyl groups (**Fig.1 compound 1**). The nitrogen atom has the capacity to form an internal coordinate with the boron atom and thus a third ring (**Dobrydneva et al., 2006**). 2-APB may also form dimers by coordination of the nitrogen and the boron atoms from two molecules (**Dobrydneva et al., 2006**).

2-APB has a dual effect on SOCE: it potentiates the Ca^{2+} entry at 1-5 μM , but inhibits it at concentration usually > 20-30 μM . Lewis' group assessed the existence of two binding sites, one potentiating, one inhibiting (**Prakriya et Lewis, 2001**). Several groups have focussed their work on the development of SOCE inhibitors. To overcome the problem of specificity of 2-APB and the need to find more specific effectors of SOCE, several analogues of 2-APB were tested. Thus Mikoshiba's group has isolated two selective inhibitors of SOCE from a chemical library consisting of about 166 analogues (**Zhou et al., 2007**). They found bisboron compounds acting as strong inhibitors of Jurkat T cell SOCE in with an ID50 of <1 μM (**Suzuki et al., 2010, Goto et al., 2009**). However, this work has been done on a cell line where 2-APB is not able to potentiate the SOCE, therefore, the effect of these bisboron compounds on potentiation remains to be seen.

In a previous work we showed that 2-APB analogues lacking the boron-oxygen core (BOC) lost their potentiating capacity (**Dellis et al., 2011**): this clearly highlighted the central role of the boron (-oxygen) atom in the potentiation process, and we hypothesised that they allow the binding to potentiating sites Furthermore, the two phenyls seem to play a role in the SOCE sensitivity to 2-APB (**Dellis et al., 2011**). Thus, by modifying the phenyl(s), we suppose it is possible to identify new molecules with the same behaviour as 2-APB, but at lower concentrations.

In the present study, we focussed our work on the properties of five new commercially available 2-APB analogues with different groups replacing one or the two phenyl groups to gain new insight in their efficacy to act on the Jurkat T cell SOCE. These compounds still

possess the BOC (= borinates) and were compared to 2-APB and two 2-APB analogues lacking the BOC (DMBA which was previously used on BL-41 B cell line, and DMPBA which had never been used before on Ca²⁺ channels, **Fig.1**).

Surprisingly, even though all five borinates possess a BOC and were supposed to potentiate the SOCE, two of the compounds have no potentiating activity and represent new SOCE inhibitors with interesting ID50. Both inhibitors strongly impairs the synthesis of interleukin-2 by PHA-stimulated Jurkat cells. As expected, some other changes in the parent molecule only modify the sensitivity for potentiation and inhibition.

MATERIAL AND METHODS

Cell lines

The Jurkat E6.1 (acute T cell leukaemia) cell line was maintained in RPMI-1640 medium (Lonza, Verviers, Belgium) supplemented with 10 % fetal calf serum and 2 mM ultra glutamine (Invitrogen, Cergy-pontoise, France), at 37°C in a 5% CO₂ humidified atmosphere.

Measurement of cytosolic Ca²⁺ concentration ([Ca²⁺]_{cyt})

The intracellular Ca²⁺ concentration was recorded by a fluorimetric ratio technique. Cells were centrifugated and resuspended in Phosphate Buffer Saline medium (PBS, Cambrex, Belgium) supplemented with 1 mg/ml Bovine Serum Albumin (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) under gentle agitation. The fluorescent indicator indo-1 was loaded by incubating the cells at room temperature for 1h with 4 μM indo-1-AM (Invitrogen/Molecular Probes, Eugene, USA). Cells were then spun down and resuspended in Hebes Buffered Saline (HBS) medium without CaCl₂ (in mM): 135 NaCl, 5.9 KCl, 1.2 MgCl₂, 11.6 Hebes, 11.5 glucose, pH 7.3 adjusted with NaOH.

One million cells were put in a 1 cm width - 3 ml quartz cuvette, and inserted in a spectrofluorophotometer (RF-1501 Shimadzu Corporation, Japan), equipped with a thermostatted (37°C) cuvette holder. Ultraviolet light of 360 nm was used for excitation of indo-1, and emission at 405 and 480 nm were recorded. Background and autofluorescence of the cells were subtracted from the values measured at 405 and 480 nm. The maximum indo-1 fluorescence ratio (R_{max}) was obtained by adding 1 μM ionomycin to the bath in the presence of 10 mM CaCl₂. Minimum fluorescence ratio (R_{min}) was determined following depletion of external Ca²⁺ by 5 mM EGTA. All the measures were sent to a PC computer and analyzed. [Ca²⁺]_{cyt} was calculated according to the equation $[Ca^{2+}]_i = Kd (R - R_{min}) / (R_{max} - R)$, where Kd is the apparent dissociation constant of indo-1 for Ca²⁺ (250 nM, (Grynkiewicz et

al., 1985)), and R is the ratio of fluorescence value at 405 nm over the fluorescence at 480 nm (**Grynkiewicz *et al.*, 1985**).

To induce SOCE, the cells were treated with 1 μ M TG in the absence of external Ca^{2+} . After 10 min, 1 mM CaCl_2 was added. For dose-response curves, the peak $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ was measured and expressed as a percentage of peak $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ measured in absence of the 2-APB analogue.

To test the effects of 2-APB and its analogues on the Ca^{2+} release by the ER, the Jurkat T cells were stimulated by 10 μ g/ml phytohemagglutinin (PHA) instead by TG, still in the absence of extracellular Ca^{2+} . PHA cross-links the T cell receptor (TCR), inducing the synthesis of IP_3 and Ca^{2+} release through IP_3 receptors (**Sugawara *et al.*, 1997**). Cells were pre-treated for 5 min with 2-APB or an analogue, and then stimulated by PHA.

IL-2 assay

One million Jurkat cells were incubated in 96-well plate for 24 h with 10 μ g/ml phytohemagglutinine and 0 or 10 μ M of certain 2-APB analogues. Then supernatants were collected and IL-2 amounts were quantified using a Quantikine Human IL-2 Immunoassay from R&D Systems (R&D Systems Europe, Lille, France).

Chemicals

2-aminoethyldiphenyl borinate (**1**, 2-APB), 2-aminoethoxydibutyl borate (**2**, 2-ABB), dimesitylborinic acid (**3**, DMBA) and other chemicals were from Sigma (Saint Quentin Fallavier, France), except bis(3,4-dimethylphenyl)borinic acid (**4**, DMPBA) which was from Clinisciences (Nanterre, France), and 2-aminoethyl 3-methoxyphenyl(phenyl)borinate (**5**, "methoxy-APB"), 2-aminoethyl 3,4-dimethoxyphenyl(phenyl)borinate (**6**, "dimethoxy-APB"),

2-(10,11-dihydro-5H-dibenzo[b,f]borepin-5yloxy)ethylamine (**7** "cyclic-APB"), 2-aminoethyl di(-benzothien-2-yl)borinate (**8**, "dibenzothienyl-APB") and 2-aminoethyl di(2-thienyl)borinate (**9**, "dithienyl-APB") which were from Specs (Delft, The Netherlands). Structures of these molecules are depicted in **figure 1**. Abbreviated trivial names (" ") were used for simplicity.

Data analysis

Comparison of the effects of the 2-APB analogues was performed using the Student's t-test. Differences with a p value < 0.05 were considered statistically significant. DRC were made with at least 5 repeats.

RESULTS

Terminal B-OH containing 2-APB analogues have lost their SOCE-potentiality ability

In a previous work, we had shown that in the absence of the ethanolamine group and with the boron atom bound to a terminal hydroxyl group, the 2-APB analogue DMBA (**Fig. 1 compound 3**) has lost its potentiation capacity on the B cell line BL-41 SOCE. We now tested its effect on the Jurkat Cell SOCE, and used another 2-APB analogue, DMPBA which can be considered as a DMBA analogue (**Fig. 1 compound 4**).

To visualize the SOCE, we treated the Jurkat cells with 1 μM thapsigargin (TG) in a Ca^{2+} -free medium during 10 min: this treatment allows the release of Ca^{2+} ions from the ER, and subsequently the opening of the Store-Operated Channels (SOC). Addition of 1 mM CaCl_2 then induced an increase of the intracellular Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) due to the entry of Ca^{2+} ions through SOC. As previously shown (**Prakriya et Lewis, 2001, Dellis et al., 2011**), 2-APB had a dual effect: potentiation at 5 μM ($217 \pm 20 \%$), inhibition for concentrations $> 30 \mu\text{M}$ (**Fig. 2A&C**).

Terminal B-OH containing DMBA and DMPBA had clearly lost their potentiation ability but were still inhibitory (**Fig. 2B&C**). The fit of the dose response curve allowed the calculation of ID50 values of 1.7 and 0.9 μM for DMBA and DMPBA, respectively (**Fig. 2C**). Thus, it seems that borinic acids can not potentiate the SOCE unlike borinates. These molecules were then used as typical inhibitory 2-APB analogues.

Next we used 2-APB analogues with minor or major changes of one or the two aromatic cycles.

Minor changes of one phenyl group reduce the SOCE potentiation

Minor changes in the 2-APB structure are known to modify the properties of the molecule on SOCE. However, as depicted by Dobrydneva et al. (**Dobrydneva et al., 2006**), changes in the phenyl groups have not been explored.

The two first compounds we used are 2-APB where one (**Fig.1, compound 5**, trivial name "methoxy-APB") or two (**compound 6** "dimethoxy-APB") methoxy group(s) was (were) added only on one phenyl group. The two "methoxylated" compounds still displayed the dual effect on the Jurkat SOCE as 2-APB, but with a difference in the efficacy (**Fig. 3A&B**). Even if the full inhibition was not changed (obtained for concentrations > 30 μM), the potentiation efficacy was reduced as clearly shown by the decreased potentiation peak concentration: $160 \pm 9 \%$ (methoxy-APB), $127 \pm 5 \%$ (dimethoxy-APB) vs. $217 \pm 21 \%$ (2-APB, **Fig. 3B**). Thus modification of one phenyl group of the 2-APB had an impact on the potentiation capacity of the molecule.

A second link between the 2 phenyl groups impairs the potentiation ability

We next analyzed the effect of major changes of the two phenyl groups. The first analogue is a 2-APB molecule with a second link (-CH₂-CH₂-) between the two phenyl groups (**Fig. 1, compound 7** "cyclic-APB").

This compound was completely unable to potentiate the Jurkat cell SOCE despite the presence of the BOC in its structure (**Fig. 4A&C**). The fit of the DRC allowed the calculation of an ID₅₀ ~ 3 μM (**Fig. 4C**). Thus the cyclic-APB properties were very similar to DMBA's (**Fig.2**) where the BOC is absent.

A larger 2-APB analogue has lost the potentiation capacity

The compound 8 is a 2-APB where the two phenyl groups are replaced by two larger benzothienyl (**Fig.1** "dibenzothienyl-APB") and therefore is larger than 2-APB. Surprisingly, dibenzothienyl-APB was unable to potentiate the SOCE although it contains a BOC, whereas inhibition was complete at a concentration $> 1 \mu\text{M}$ (**Fig. 4B&C**). The fit of the dose-response curve allowed the calculation of an $\text{ID}_{50} \sim 0.4 \mu\text{M}$ (**Fig. 4C**).

Smaller 2-APB analogues are less active

In a previous work, we showed that the replacement of the two phenyl by two butyl groups (**Fig. 1** 2-ABB) only induced a loss of sensitivity (**Dellis et al., 2011**).

2-ABB potentiated and inhibited Jurkat cell SOCE. The peak of potentiation was reached at a concentration of $30 \mu\text{M}$ ($203 \pm 17\%$). The total inhibition began from a concentration of $100 \mu\text{M}$ (**Fig. 5B**). In comparison with 2-APB, 2-ABB had conserved the dual effect and the same efficacy but its sensitivity was diminished. Thus, the intensity of potentiation with $30 \mu\text{M}$ 2-ABB was similar to the one obtained with $3 \mu\text{M}$ 2-APB (**Fig. 5B**).

Compound 9 ("dithienyl-APB") is a smaller analogue than 2-APB with two thienyls instead of phenyls (**Fig. 1**). This compound was also able to potentiate and inhibit the Jurkat cell SOCE as 2-APB (**Fig. 5A&B**). Maximum of SOCE potentiation was obtained with $30 \mu\text{M}$ ($186 \pm 15\%$) and full inhibition at $> 300 \mu\text{M}$ (**Fig. 5B**). Thus dithienyl-APB activity was similar to 2-ABB's.

Ca^{2+} release by the ER is decreased by the new 2-APB analogues

The main impairment for the use of 2-APB in therapies is its lack of specificity. In fact, 2-APB was firstly described as an IP_3R blocker (**Maruyama et al., 1997**). To study the specificities for SOCE of these new analogues, we measured the Ca^{2+} -release from the ER

after stimulation of Jurkat cells with 10 µg/ml phytohemagglutinin (PHA) in the absence of extracellular Ca^{2+} . Thus, all the $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ variations are due to the Ca^{2+} release from the ER without any Ca^{2+} influx.

In these conditions, $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ quickly increased by ~ 35 nM and then decayed slowly (**Fig. 6**). The two "methoxylated" 2-APB analogues, used at the potentiating concentration of 5 µM were added 5 min prior to PHA and clearly decreased the PHA-induced Ca^{2+} release by ~ 85% (**Fig. 6B**). The other compounds were used at fully inhibiting concentrations. They were all efficient inhibitors of the Ca^{2+} release, with inhibition between 79 (DMBA) and 99% (dibenzothienyl-APB, **Fig. 6A&B**).

The 2-APB inhibitor analogues decrease the IL-2 synthesis by PHA-stimulated Jurkat cells

When Jurkat T cells are stimulated by phytohemagglutinin, IL-2 is synthesized and secreted (**Chung *et al.*, 1994**). Inhibition of the PHA-induced Ca^{2+} influx by SKF96365 impairs the IL-2 synthesis (**Chung *et al.*, 1994**).

We next tested the biological activity of the four new inhibitors of SOCE, which we characterized at 10 µM. As shown in figure 7, without stimulation, Jurkat cells did not produce any detectable amount of IL-2 (**Fig. 7**). On the contrary, PHA stimulation induced the synthesis of ~ 1 µg IL-2/ml. Cyclic-APB, DMBA and DMPBA inhibited ~ 75 % of the IL-2 synthesis, dibenzothienyl-APB inhibited by ~ 98 % (**Fig. 7**).

DISCUSSION

2-APB is an important tool to characterize calcium influx in leukocytes and other cells. 2-APB was first described as an inhibitor of Ca^{2+} -release from the ER acting on the IP_3R (**Maruyama et al., 1997**). This molecule has dual effect on the Ca^{2+} influx, known as SOCE: potentiation at low concentrations (1 – 5 μM) and inhibition at higher (> 30 μM) (**Prakriya et Lewis, 2001, Dellis et al., 2011**). To obtain compounds with therapeutic use, the specificity of 2-APB must be improved. To this end, understanding the functional effects of the structural features of 2-APB would allow a rational design of new analogues.

In this study, we characterize new inhibitors of Jurkat cell SOCE. We found that small modifications on the two phenyls of the molecule may be sufficient to suppress potentiation and increase the inhibition capacity.

Potentiation and inhibition of SOCE by 2-APB and its analogues may rely on binding to the same protein, most likely the channel Orai1, or even on the same binding site. However, most authors favour the idea of multiple binding sites and perhaps multiple target proteins, for example the channel and its regulator STIM (**Peinelt et al., 2008, Dehaven et al., 2008, Prakriya et Lewis, 2001**). We observe that small changes in the phenyl groups, such as 2-APB vs. cyclic-APB and dibenzothienyl-APB vs. dithienyl-APB, determine the potentiation activity without affecting the inhibitory action. These data are clearly in favour of a potentiation site which is not accessible for all compounds and which is distinct from the inhibition site.

DMPBA and DMBA with respectively two and three additional methyl groups on each phenyl are unable to potentiate Jurkat cell SOCE as well as cyclic-APB in which the two phenyls are linked by an ethyl bridge ($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$). The absence of potentiation was expected with DMBA/DMPBA because the molecules lack the BOC, which is required for the potentiating activity (**Dellis et al., 2011**). However, the absence of potentiation by the cyclic-

APB is surprising, the BOC appears unfunctionnal. Two explanations can be suggested: **(1)** Potentiation may require that the two phenyls are in a certain orientation with respect to the BOC or with respect to each other; the ethyl bridge between these two phenyls impairs the free rotation of the two groups, restricting the conformation of the molecule and thereby prevents the potentiating activity. **(2)** The BOC must reach the potentiating site of SOC channel but the link between the phenyls prevents the access of the BOC core to the site of potentiation.

We also expected a potentiation with dibenzothienyl-APB, which contains the BOC linked to two benzothienyl groups, which can freely rotate. Surprisingly, the potentiation was absent while a strong inhibition of Jurkat cell SOCE occurred with an ID50 = 0,4 μ M. The absence of potentiation may be explained by the steric crowding caused by the two larger benzothienyl groups that prevent the access of the BOC to the potentiation site. Remarkably, the smaller thienyl groups found in dithienyl-APB do not prevent potentiation by this compound but reduce its apparent affinity compared to 2-APB. Interestingly, thienyl-APB activity is very similar to 2-ABB's, meaning the target of these molecules can not distinguish between thienyl and butyl groups. Thus, analogues with smaller lateral groups than phenyl probably have the same profile of dual effect on SOCE.

Smaller modifications in one of the two phenyls by adding 1 or 2 methoxy group(s) (methoxy- and dimethoxy-APB) appear to decrease gradually the potentiating activity on Jurkat cell SOCE observed with 2-APB. In this case, the methoxy group may affect the BOC of the molecule because of its electronegativity. Consequently, the perturbed BOC core is less efficient in potentiating the Jurkat cell SOCE. The two "methoxylated" analogues kept the potentiation capacity at the same concentration as 2-APB (5 μ M) but with a weaker intensity.

We proposed in a previous study a correlation between the number of rings (true rings + the ring created by the internal coordinate between N and B) and the

potentiation/inhibition activity (**Dellis et al., 2011**). This correlation is confirmed by the analogues cyclic-APB and dibenzothienyl-APB having 3 (+1 internal coordinate) and 4 (+1) rings respectively compared to 2 (+1) rings for 2-APB with a corresponding shift towards stronger affinity for SOCE inhibition. Thus the number of rings plays a role in the sensitivity of the molecule.

The most sensitive inhibitor is dibenzothienyl-APB. Its increased inhibition ability may be due to the stable attachment of the molecule to the inhibitory site *via* the benzothienyl group that could constitute a kind of hook and strengthens the inhibition capacity. Dibenzothienyl-APB is probably the most interesting molecule among the new 2-APB analogues we characterized: indeed with an ID50 < 1 μ M, this molecule is significantly more potent than the classical SOCE inhibitor SKF96365 (**Chung et al., 1994**). Thus dibenzothienyl-APB is one of the best commercially available inhibitors of the SOCE at that time.

Furthermore, when focussed on analogues where the two phenyls were replaced by simple rings or small hydrophobic groups (dibenzothienyl-APB, dithienyl-APB and 2-ABB) the type (and the size) of the groups seems to be important: the thienyl group (in dithienyl-APB) is as efficient as the "no-ring" group = butyl (in 2-ABB) whereas the larger benzothienyl groups are more efficient. It implies that either the inhibition abilities of these molecules are due to the ethanolamine (free or forming the N-B internal coordinate), or butyl and thienyl have the same efficacy. 2-APB with two six carbon based cycles is more efficient. The nature of the lateral amine group plays a role in the inhibition ability of 2-APB analogues on the Ca^{2+} release (**Dobrydneva et al., 2006**). Thus, in 2-APB, the two phenyl and the ethanolamine groups are implied in the inhibitory capacity.

The two "methoxylated" analogues both inhibit with the same manner as 2-APB at concentrations above 30 μ M. However their potentiation capacity is reduced, which consolidates our hypothesis that the potentiating and inhibitory sites on SOC channel

complex are separated. When both phenyl groups are modified with one methoxy group each, the inhibition of SOCE in CHO cells was actually weaker than with 2-APB (**Zhou et al., 2007**). However, 2-APB did not potentiate SOCE in the CHO cell. It would be instructive to use that compound in cells where 2-APB potentiates SOCE.

Prakriya et al. suggested that 2-APB monomers may be responsible for potentiation and dimers, which are formed at higher concentrations, could be responsible for inhibition of SOCE (**Prakriya et Lewis, 2001**). Interestingly, screens of 2-APB analogues identified more potent inhibitors of SOCE containing 2 BOC cores like a dimer (**Zhou et al., 2007**). Our data show that potentiation activity may be lost with some monomers. However, 2-APB and all the BOC-containing analogues may form dimers by intermolecular coordination bonds between the amino groups of one monomer and the bore atom of another monomer (**Dellis et al., 2011, Dobrydneva et al., 2006**). It is not clear, which percentage of 2-APB or the analogues is present as dimers under physiological conditions. We do not know, whether the phenyl modifications described here influence the proportion of dimers.

The effect of the 2-APB analogues on Ca^{2+} -release from the ER was also investigated in this work to detect changes in their specificity. The results demonstrated that all the molecules described here also target the IP_3R and inhibit Ca^{2+} -release from the ER at concentrations where they inhibit or potentiate SOCE. Thus modifications on the phenyl ring are not sufficient to prevent interference with the IP_3R . Since most articles on 2-APB analogues examine calcium flux in one particular cell-type, it remains to be seen whether different cells containing different isoforms of the IP_3R have distinct sensitivities for these analogues. 2-APB is clearly inhibiting IP_3Rs with different efficiency in various cell types (**Bootman et al., 2002**).

The synthesis of IL-2 by the stimulated - T lymphocytes is absolutely required for their proliferation by an autocrine process (**Chung et al., 1994**). When we used a concentration of 10 μM , DMBA, DMPBA and cyclic-APB decreased the Ca^{2+} release by 80-93% (**Fig. 6**) and

the Ca^{2+} influx by a ~ 90% (**Fig. 2&4**): this large inhibition is not enough to block totally the synthesis of IL-2 which is "only" reduced by 75 %. On the contrary, dibenzothienyl-APB is a strong inhibitor of the two Ca^{2+} fluxes: >99% and >98% of the Ca^{2+} release and the influx respectively, impairing the synthesis of IL-2 and the activation of the Jurkat cell. This shows that larger aryl cycles than phenyl could provide more efficient compounds to inhibit cell activation.

In conclusion, the potentiation activity of 2-APB analogues is highly sensitive to modifications of the phenyl groups. We characterized two potentially interesting molecules: dithienyl-APB and dibenzothienyl-APB are only inhibitors with better sensitivity than 2-APB (ID50 of 3 and 0.4 μM respectively). These compounds are added to a list of products which allow a better characterization of calcium influx in leukocytes, give more information about the SOCE mechanism and represent the first step for development of new immunomodulators that could be used in clinic.

REFERENCES

- Bootman MD, Collins TJ, Mackenzie L, Roderick HL, Berridge MJ and Peppiatt CM (2002) 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) is a reliable blocker of store-operated Ca²⁺ entry but an inconsistent inhibitor of InsP₃-induced Ca²⁺ release. *FASEB J* **16**(10):1145-1150.
- Chung SC, McDonald TV and Gardner P (1994) Inhibition by SK&F 96365 of Ca²⁺ current, IL-2 production and activation in T lymphocytes. *Br J Pharmacol* **113**(3):861-868.
- DeHaven WI, Smyth JT, Boyles RR, Bird GS and Putney JW, Jr. (2008) Complex actions of 2-aminoethyl diphenyl borate on store-operated calcium entry. *J Biol Chem* **283**(28):19265-19273.
- Dellis O, Mercier P and Chomienne C (2011) The boron-oxygen core of borinate esters is responsible for the store-operated calcium entry potentiation ability. *BMC Pharmacol* **11**(1):1.
- Dobrydneva Y, Abelt CJ, Dovel B, Thadigiri CM, Williams RL and Blackmore PF (2006) 2-aminoethoxydiphenyl borate as a prototype drug for a group of structurally related calcium channel blockers in human platelets. *Mol Pharmacol* **69**(1):247-256.
- Feske S, Picard C and Fischer A (2010) Immunodeficiency due to mutations in ORAI1 and STIM1. *Clin Immunol* **135**(2):169-182.
- Goto JI, Suzuki AZ, Ozaki S, Matsumoto N, Nakamura T, Ebisui E, Fleig A, Penner R and Mikoshiba K (2010) Two novel 2-aminoethyl diphenylborinate (2-APB) analogues differentially activate and inhibit store-operated Ca(2+) entry via STIM proteins. *Cell Calcium* **47**:1-10.

- Grynkiewicz G, Poenie M and Tsien RY (1985) A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* **260**(6):3440-3450.
- Hoth M and Penner R (1992) Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium current in mast cells. *Nature* **355**(6358):353-356.
- Hu HZ, Gu Q, Wang C, Colton CK, Tang J, Kinoshita-Kawada M, Lee LY, Wood JD and Zhu MX (2004) 2-aminoethoxydiphenyl borate is a common activator of TRPV1, TRPV2, and TRPV3. *J Biol Chem* **279**(34):35741-35748.
- Lievremont JP, Bird GS and Putney JW, Jr. (2005) Mechanism of inhibition of TRPC cation channels by 2-aminoethoxydiphenylborane. *Mol Pharmacol* **68**(3):758-762.
- Maruyama T, Kanaji T, Nakade S, Kanno T and Mikoshiba K (1997) 2APB, 2-aminoethoxydiphenyl borate, a membrane-penetrable modulator of Ins(1,4,5)P₃-induced Ca²⁺ release. *J Biochem* **122**(3):498-505.
- Mc Cormack T, Baumeister W, Grenier L, Moomaw C, Plamondon L, Pramanik B, Slaughter C, Soucy F, Stein R, Zuhl F and Dick L (1997) Active site-directed inhibitors of Rhodococcus 20 S proteasome. Kinetics and mechanism. *J Biol Chem* **272**(42):26103-26109.
- Missiaen L, Callewaert G, De Smedt H and Parys JB (2001) 2-Aminoethoxydiphenyl borate affects the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor, the intracellular Ca²⁺ pump and the non-specific Ca²⁺ leak from the non-mitochondrial Ca²⁺ stores in permeabilized A7r5 cells. *Cell Calcium* **29**(2):111-116.
- Peinelt C, Lis A, Beck A, Fleig A and Penner R (2008) 2-Aminoethoxydiphenyl borate directly facilitates and indirectly inhibits STIM1-dependent gating of CRAC channels. *J Physiol* **586**(13):3061-3073.

- Prakriya M and Lewis RS (2001) Potentiation and inhibition of Ca(2+) release-activated Ca(2+) channels by 2-aminoethyldiphenyl borate (2-APB) occurs independently of IP(3) receptors. *J Physiol* **536**(Pt 1):3-19.
- Sugawara H, Kurosaki M, Takata M and Kurosaki T (1997) Genetic evidence for involvement of type 1, type 2 and type 3 inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in signal transduction through the B-cell antigen receptor. *EMBO J* **16**(11):3078-3088.
- Suzuki AZ, Ozaki S, Goto JI and Mikoshiba K (2010) Synthesis of bisboron compounds and their strong inhibitory activity on store-operated calcium entry. *Bioorg Med Chem Lett* **20**(4):1395-1398.
- Zhou H, Iwasaki H, Nakamura T, Nakamura K, Maruyama T, Hamano S, Ozaki S, Mizutani A and Mikoshiba K (2007) 2-Aminoethyl diphenylborinate analogues: selective inhibition for store-operated Ca²⁺ entry. *Biochem Biophys Res Commun* **352**(2):277-282.
- Zweifach A and Lewis RS (1993) Mitogen-regulated Ca²⁺ current of T lymphocytes is activated by depletion of intracellular Ca²⁺ stores. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(13):6295-6299.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Structure of 2-APB (compound 1) and 2-APB analogues (compounds 2 to 9) used in this study (see method section).

Figure 2. 2-APB has a dual effect on Jurkat T cell SOCE while DMBA and DMPBA are only inhibiting. (A&B) Representative measurement of cytosolic Ca^{2+} variation using indo-1 fluorescence. Cells were treated for 10 min with 1 μM TG to allow Ca^{2+} release from ER and the opening of SOC. After 10 min, 1 mM CaCl_2 was re-added allowing Ca^{2+} entry through SOC. Different 2-APB (A) or DMPBA (B) concentrations were applied 30 s prior CaCl_2 . Error bars were omitted for clarity (S.E.M < 70 nM). (C) Dose-response curve of 2-APB, DMPBA and DMBA on Jurkat cell SOCE. Experiments were done as in A and B, and peak $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ was expressed as % of peak $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ obtained in absence of 2-APB or analogues. The 2-APB and analogues were added 30 s prior to CaCl_2 addition.

Figure 3. Addition of methoxy group(s) on one phenyl reduces the potentiation ability of the molecules. (A) Experiments were done as in Fig.2, except that dimethoxy-APB was used at different concentrations instead of 2-APB (same was done with DMPBA, but not shown). (B) Dose-response curve of 2-APB, methoxy-APB and dimethoxy-APB on Jurkat cell SOCE. DRC was prepared as in Fig. 2C.

Figure 4. Cyclic-APB and dibenzothienyl-APB are strong SOCE inhibitors. (A&B) Experiments were done as in Fig.2, except that cyclic-APB (A) or dibenzothienyl-APB were used at different concentrations instead of 2-APB. (C) Dose-response curve of 2-APB, cyclic-APB and dibenzothienyl-APB on Jurkat cell SOCE. DRC was prepared as in Fig. 2C.

Figure 5. 2-ABB and dithienyl-APB have kept dual effect on SOCE. (A) Experiments were done as in Fig.2, except that dithienyl-APB was used at different concentrations instead of 2-APB. (B) Dose-response curve of 2-APB, dithienyl-APB and 2-ABB on Jurkat cell SOCE. DRC was prepared as in Fig. 2C.

Figure 6. All 2-APB analogues are ER Ca^{2+} release inhibitors. (A) Representative measurement of cytosolic Ca^{2+} variation using indo-1 fluorescence. Cells were treated 10 min with PHA 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ to allow Ca^{2+} release from ER by IP_3R in absence of extracellular Ca^{2+} ions. 2-APB analogues were added in a 10 min-pretreatment to cells before addition of PHA. (B) Bar graph comparing the peak $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ induced by PHA in absence and presence of the 2-APB analogues.

Figure 7. Cyclic-APB, dibenzothienyl-APB, DMBA and DMPBA are inhibitors of the IL-2 synthesis by PHA-stimulated Jurkat cells. One million Jurkat cells were incubated 24 h with 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PHA and 0 or 10 μM of certain 2-APB analogues. Then supernatants were collected and IL-2 amounts were quantified using an Elisa kit from R&D Systems. Data are mean \pm S.E.M 5 from independent experiments.

Figure 1

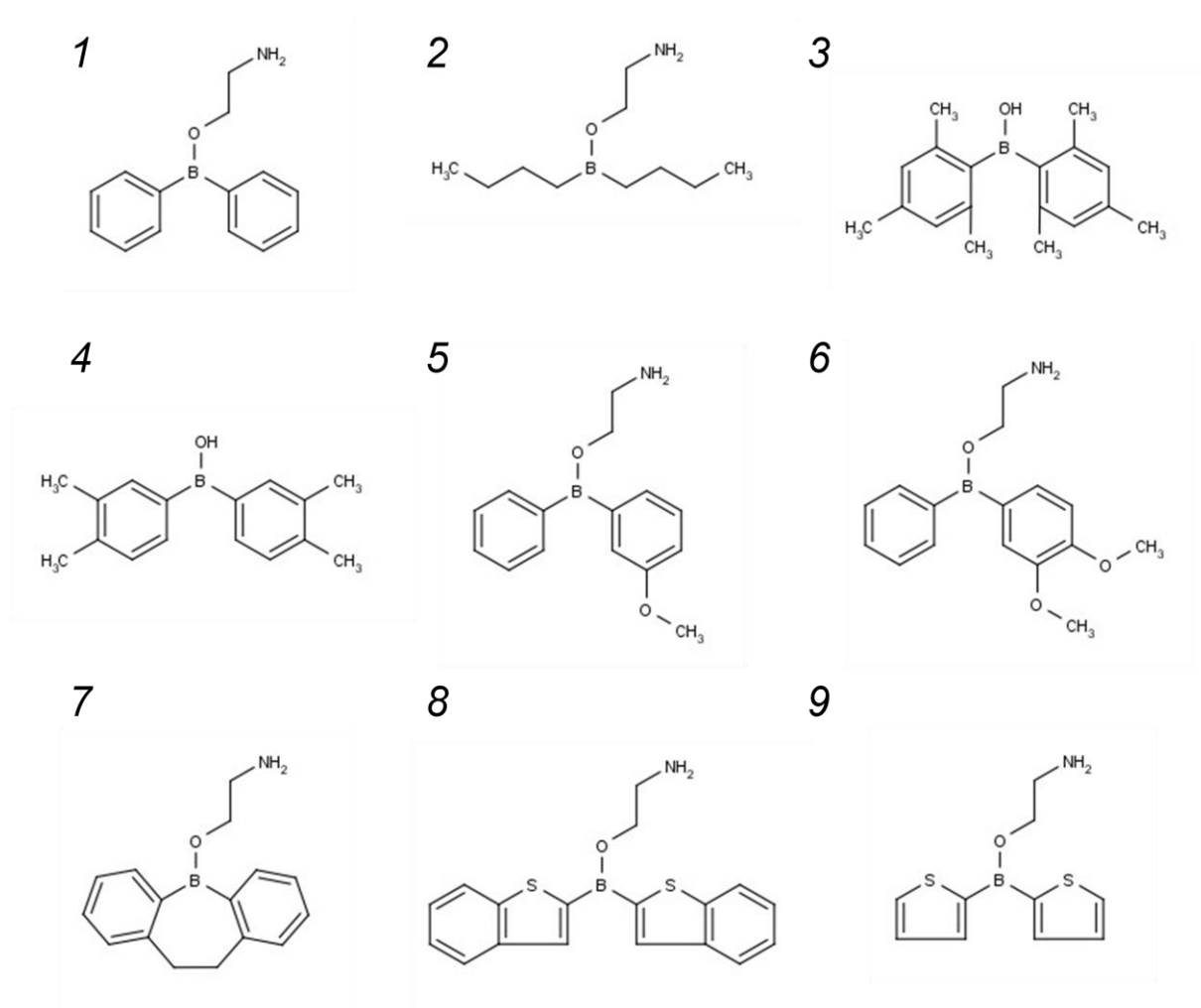


Figure 2

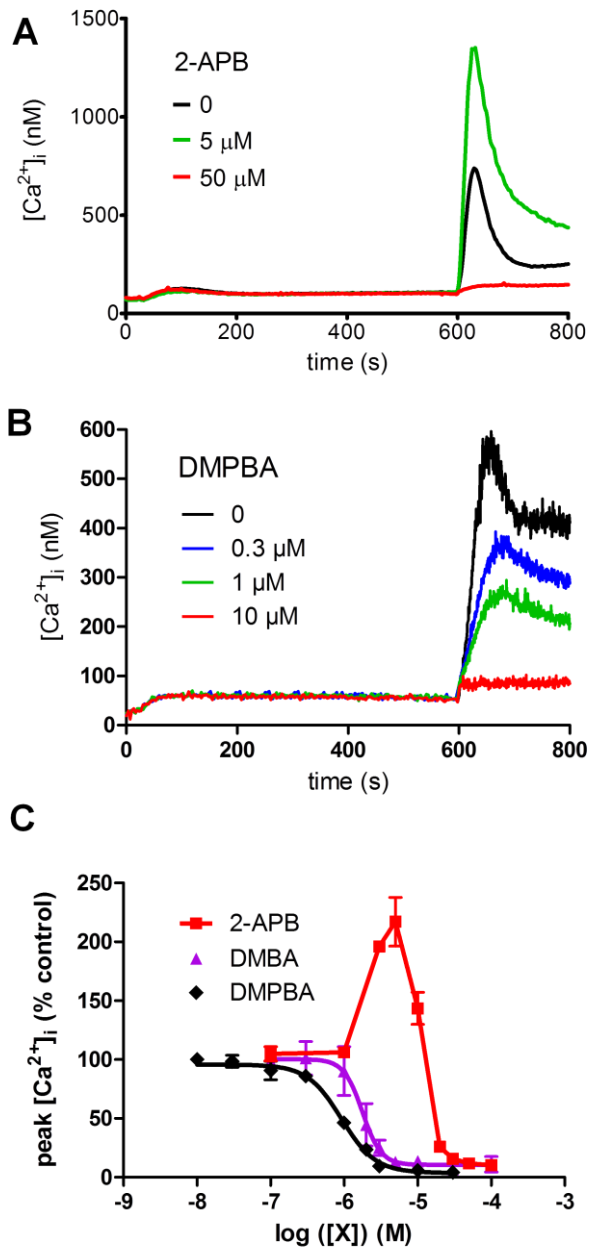


Figure 3

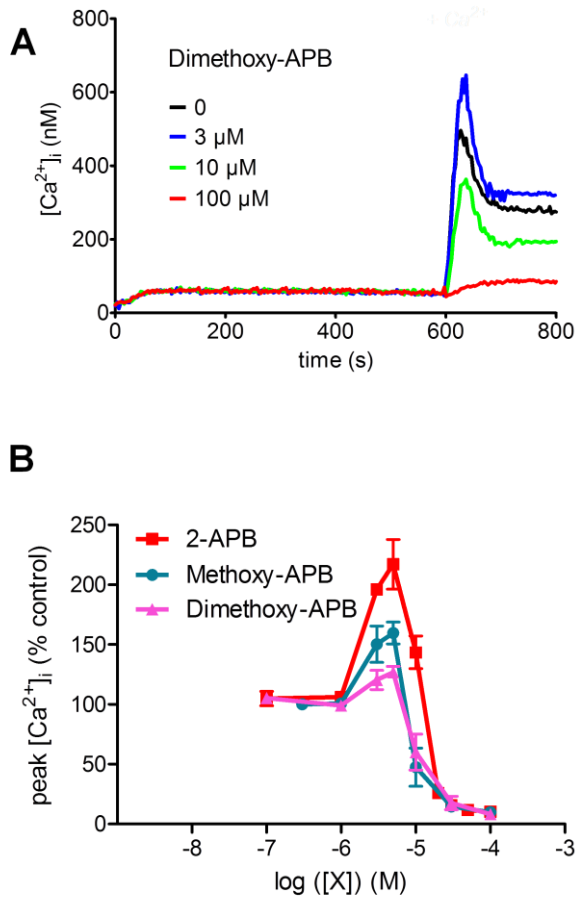


Figure 4

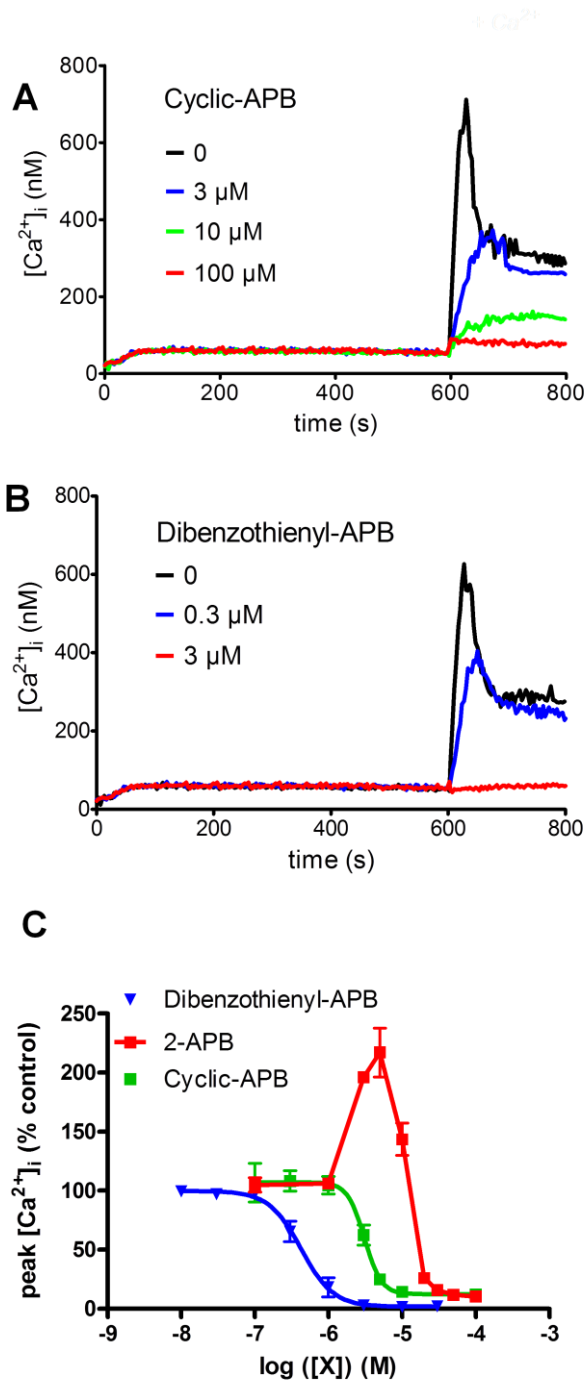


Figure 5

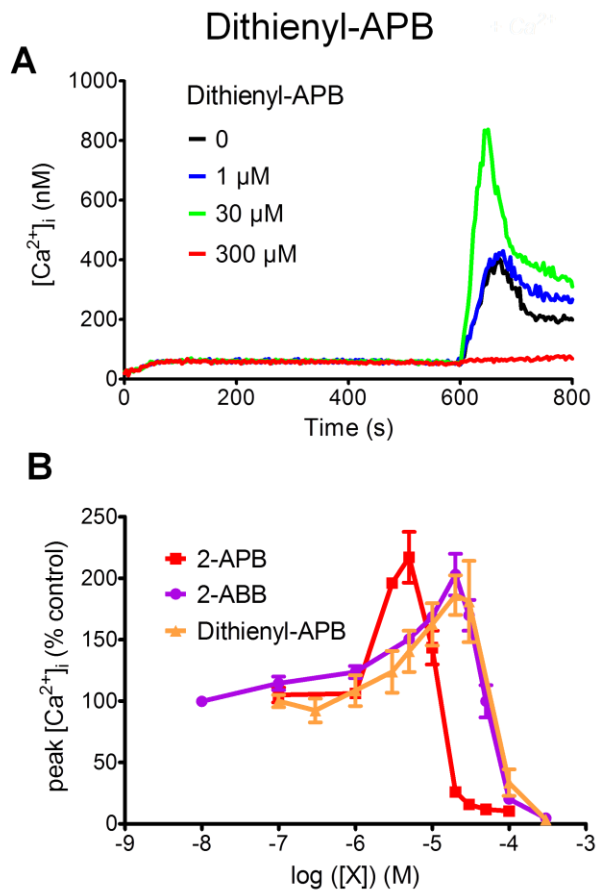


Figure 6

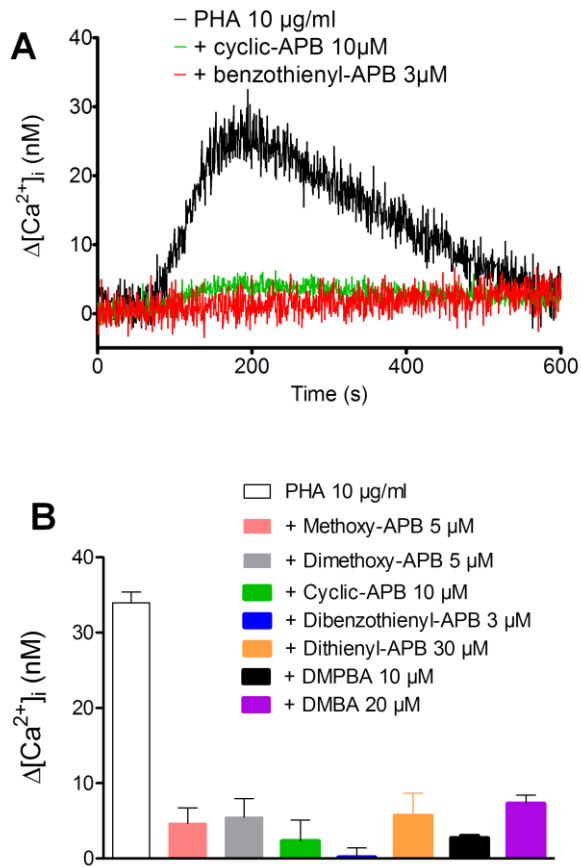
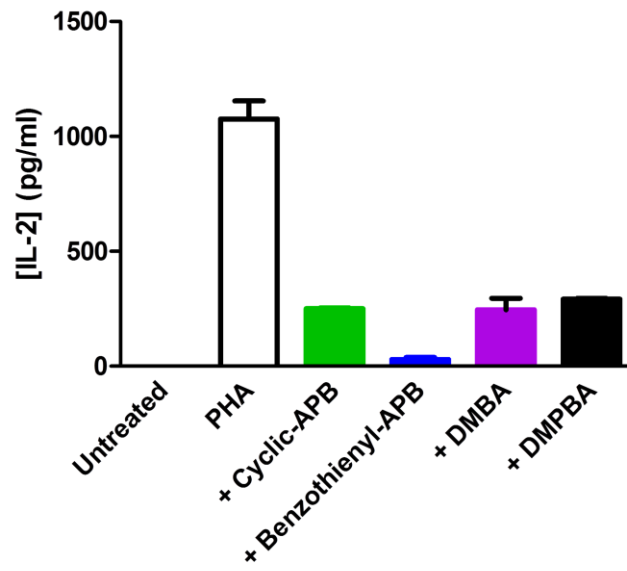


Figure 7



MANUSCRIT N°2

B. MANUSCRIT N°2

TITLE PAGE:

Methyl Diethylborinate (MDEB): a new and promising Store-Operated Calcium Entry (SOCE) potentiating agent

Alaeddine DJILLANI ^{†,‡}

Christine CHOMIENNE [¶]

Olivier DELLIS ^{†,‡,*}

[†] Univ Paris-Sud, rue Georges Clémenceau, 91405 Orsay, France

[‡] UMR-S 757 INSERM, rue des Adèles, 91405 Orsay, France

[¶] UMR-S 940 INSERM, Institut Universitaire d'Hématologie, Hôpital Saint Louis, 1 avenue Claude Vellefaux, 75010 Paris, France

* corresponding author

§

KEYWORDS:

Calcium channels

T lymphocytes

Effector

Patch-clamp

Spectrofluorimetry

SOCE

ABSTRACT:

The store-operated calcium entry (SOCE) is the main calcium entry of non-excitabile cells. In the past decade, the activation of this entry has been unveiled, with STIM1, a protein of the endoplasmic reticulum able to sense the intraluminal Ca^{2+} content, and Orai1, the pore-forming protein of the Ca^{2+} release activated channels. As Ca^{2+} is implicated in various cellular processes, the discovery of new drugs acting on the SOCE should be of interest to control the cell activity. 2-aminoethyl diphenylborinate (2-APB) is a well known compound with inhibitory and potentating effects on the SOCE but it lacks specificity. By testing analogues of 2-APB, we identified the methoxy diethylborinate (MDEB), a molecule only able to potentiate the SOCE of three leukocyte cell lines. This compound reduces the extent of the Ca^{2+} -dependent fast inactivation of the CRAC current (I_{CRAC}), allowing an increase of the I_{CRAC} amplitude. Unlike 2-APB, MDEB does not inhibit the sequestration of Ca^{2+} ions and the phytohemagglutinin-induced Ca^{2+} release by the endoplasmic reticulum. Thus, MDEB could represent the first member of molecules only able to potentiate the SOCE, and with a higher specificity of action.

MAIN TEXT:

INTRODUCTION

Ca^{2+} signalling is implied in various cellular processes like secretion, proliferation and migration (**Berridge *et al.*, 2000**). Due to this key role in cell physiology of excitable and non-excitabile cells such as leukocytes, the discovery of drugs acting on the Ca^{2+} signalling is of interest. Thus, the widely used cyclosporine and FK-506 in treatment after engraftment inhibit calcineurin, a Ca^{2+} -dependent enzyme which is absolutely required during T cell activation (**Liu, 2009**). Upstream of the Ca^{2+} signalling are Ca^{2+} channels, and the control of the channel activity by drugs is a common feature of pharmacology.

Store-Operated Calcium (SOC) channels have been first characterized on mast cells and T lymphocytes in the early 90s (**Hoth et Penner, 1992, Lewis et Cahalan, 1989**). Thus, when a T cell is stimulated *via* the T cell receptor, inositol 1,4,5- trisphosphate (IP_3) is synthesised and induces the release of Ca^{2+} ions by the endoplasmic reticulum (ER). This release allows the opening of the so-

called Store-Operated Calcium channels of the plasma membrane, allowing a massive Ca^{2+} influx (known as Store-Operated Calcium Entry = SOCE), which is absolutely required for the T cell activation (**Zweifach et Lewis, 1993**). However, the key proteins responsible for the SOCE were only molecularly described less than five years ago: STIM1 present in the ER membrane, which is able to sense the intraluminal Ca^{2+} concentration, and Orai1 present in the plasma membrane which is the pore of the SOC channel (**Feske et al., 2006, Feske, 2010**). After cell stimulation and during Ca^{2+} release by the ER, STIM1 proteins oligomerize and translocate toward the PM, but still remain in the ER membrane, where they physically interact with Orai1 channels to allow their opening and the Ca^{2+} influx, sustaining an increase of the cytosolic Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$) (**Feske, 2010, Putney, 2007**).

Mutations of STIM1 or Orai1 genes, responsible for the absence or deficiency of the corresponding protein, induce the phenotype of severe combined immunodeficiency (SCID): T cells are well developed, but can not be activated (**Feske, 2010**). Interestingly, two Orai1 paralogues exist, Orai2 and Orai3 and one for STIM1, STIM2. The three Orai proteins can form SOCE, and STIM2 is able to activate these proteins in heterologous expression systems (**Gwack et al., 2007, Soboloff et al., 2006, Lis et al., 2007**). However, only Orai1 expression can fully correct the SCID phenotype in Orai1-deficient cells even if Orai2 and Orai3 are also expressed (**Gwack et al., 2007**), highlighting the key role of Orai1, and the still mysterious functions of Orai2/3. Recently, it has been shown that Orai3 channels are the channels responsible of the native SOCE of estrogen receptor – positive breast cancer cells (**Motiani et al., 2010**), and Orai2 channels in dendritic cells (**Bandyopadhyay et al., 2010**).

Due to the key role of these channels, it is of interest to develop effectors of Orai channels as they could represent new immuno-modulators or a new way to cure some cancers such as leukemias. Thus, econazole and ketotifen, two compounds known to block the SOCE seem to be able to purge bone marrow of leukemic cells, due to a higher sensitivity of these cells to SOCE inhibitors (**Soboloff et al., 2002**). A blocker of Orai1 channel could be a new way to stop the activity of neutrophils during inflammatory stress. We may also predict that an opener of Orai1 channels and a compound able to render Orai2/Orai3 channels active would be interesting for patients with immunodeficiency to increase their immune response. Such a potentiating molecule could also be used to induce an excess of Ca^{2+} entry to stop cellular activity by Ca^{2+} toxicity (**Farber, 1990**).

Our aim is to develop new effectors of SOCE. 2-aminoethyl diphenylborinate (2-APB, **Fig. 1**), a molecule commonly used to act on SOCE, seems to be a very interesting molecule, even if this compound lacks specificity as it can inhibit IP_3 receptors, SERCA, and some TRP channels as well

(**Maruyama et al., 1997, Lievremont et al., 2005, Bilmen et al., 2002**). It can also open some TRPC channels (**Chung et al., 2004, Hu et al., 2004**). Furthermore, 2-APB has a dual effect on SOCE: potentiating at 1-5 μ M, inhibiting at > 50 μ M (**Prakriya et Lewis, 2001**). Few publications have documented the synthesis of 2-APB analogues, but only in the view to develop more specific inhibitors (**Dobrydneva et Blackmore, 2001, Dobrydneva et al., 2006, Zhou et al., 2007, Suzuki et al., 2010**).

In an attempt to determine which part of the 2-APB is needed for the potentiating and/or inhibiting ability, we previously recorded the SOCE of three leukemia cell lines in the presence of 2-APB or several analogues: we clearly showed that the boron-oxygen core (BOC) of the molecule is an absolute requirement for the potentiating capacity, but not for the inhibitory ability of the molecules (**Dellis et al., 2011**). However the new potentiating molecules we identified were still also inhibitory at high concentrations (**Dellis et al., 2011**).

Here we focussed our interest on a new 2-APB analogue, the methyl diethylborinate (MDEB), which is almost restricted to the BOC. MDEB appeared to be the first molecule only able to potentiate the SOCE, and could represent the first member of a promising family.

MATERIALS AND METHODS

Cells

Jurkat (acute T cell leukemia), BL-41 (Burkitt B lymphoma) and U937 (monocytic cell line) cell lines were maintained in RPMI-1640 medium (Lonza, Levallois-Perret, France) supplemented with 10 % heat-inactivated fetal calf serum and 2 mM L-glutamine. Epstein-Barr Virus immortalized B cells from Orai1-deficient and wild type patients were a kindly gift of Dr Picard and Pr Fischer (Study center of primary immunodeficiencies, AP-HP, Hôpital Necker, Paris, France). Written informed consent was obtained from the parents of the patients. The experiments were conducted after approval was given by the institutional review boards at Necker-Enfants Malades Hospital (Paris, France). All cell lines were maintained at 37 °C in a 5% CO₂ humidified atmosphere.

Measurement of cytosolic Ca²⁺ concentration ([Ca²⁺]_{cyt})

[Ca²⁺]_{cyt} was recorded by a fluorimetric ratio technique (Grynkiewicz *et al.*, 1985, Dellis *et al.*, 2002). Leukocytes were spinned and resuspended at a density of 10⁶ cells/ml in Phosphate-Buffered Saline (PBS) supplemented with 1 mg/ml bovine serum albumin and incubated in the dark with 4 μM Fura-2-AM for one hour at room temperature under slow agitation. Cells were then centrifuged and resuspended in calcium-free Hepes Buffered Saline solution (HBS; 135 mM NaCl, 5.9 mM KCl, 1.2 mM MgCl₂, 11.6 mM Hepes, 11.5 mM glucose adjusted to pH 7.3 with NaOH) prior to measurement. After centrifugation, 1 x 10⁶ cells were suspended in 3 ml HBS in a quartz cuvette and inserted into a spectrofluorophotometer (RF-1501 Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) connected to a PC computer (Dell Computer Corp, Montpellier, France). A temperature of 37°C was maintained by circulating water from a bath. Ultraviolet light of 340 and 380 nm were used for excitation of Fura-2, and emission at 510 nm was recorded. Background and autofluorescence of the cell suspension were subtracted from the recordings and the ratio R of fluorescence values recorded at 510 nm after excitation at 340 and 380 nm was calculated. The maximum Fura-2 fluorescence ratio (R_{max}) was obtained by adding 1 μM ionomycin to the cell suspension in the presence of 10 mM CaCl₂. Minimum fluorescence ratio was determined following depletion of external Ca²⁺ by 5 mM EGTA. [Ca²⁺]_i was calculated according to the equation $[Ca^{2+}]_i = K_d (R - R_{min}) / (R_{max} - R)$, where K_d is the apparent dissociation constant of Fura-2-calcium complex (250 nM) (Grynkiewicz *et al.*, 1985).

In all the experiments, cells placed into a quartz cuvette, were treated with 1 μM thapsigargin (TG) during 10 min in Ca²⁺-free HBS to induce the calcium release from the ER and the

opening of SOC (Dellis *et al.*, 2002). Then, 1 mM CaCl₂ was added to measure variation of [Ca²⁺]_{cyt} in response to calcium influx (Dellis *et al.*, 2002). At the end of each experiment, 1 μM GdCl₃, an inhibitor of SOCE, was added to verify that MDEB only acts on the SOCE (Motiani *et al.*, 2010).

To study directly the divalent ion influx through the store-operated channels, we performed Mn²⁺ quenching of Fura-2. Mn²⁺ ions bind to Fura-2 and quench the 510 nm emission wavelength fluorescence after excitation at 360 nm. The decrease of fluorescence is directly dependent on the Mn²⁺ entry through SOC. For measurements, cells were treated 10 min with 1 μM TG, then 100 μM MnCl₂ were added instead CaCl₂.

To test the effects of MDEB on the Ca²⁺ release from the ER, the Jurkat cells were stimulated by 10 μg/ml phytohemagglutinin (PHA) instead of TG, still in the absence of extracellular Ca²⁺. PHA cross-links the T cell receptor (TCR), inducing the synthesis of IP₃ and Ca²⁺ release through IP₃ receptors (Dellis *et al.*, 2002). Cells were pretreated for 5 min with MDEB and then stimulated by 10 μg/ml PHA.

2-APB is also known as an inhibitor of SERCA (Bilmen *et al.*, 2002). To indirectly test the activity of SERCA in presence of 1 mM MDEB, we estimated the ER Ca²⁺ amount, which is directly dependent on SERCA activity (Dellis *et al.*, 2009). Cells were placed in a HBS where all Na⁺ ions were replaced by Li⁺ ions to block the activity of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger. 1 mM MDEB was applied during 5 min. Then 1 μM TG (to induce the ER Ca²⁺ release) and 0.4 μM HgCl₂ (to block the activity of Plasma Membrane Ca²⁺ ATPases (Dellis *et al.*, 2009)) were added. All the Ca²⁺ previously in the ER lumen are trapped in the cytosol (Dellis *et al.*, 2009).

Patch-clamp measurements

Cells for patch-clamp experiments were allowed to adhere to a poly-D-ornithine-coated Petri dish for 10 min. Each dish was then rinsed twice with the bath solution containing 160 mM NaCl, 4.5 mM KCl, 10 mM CaCl₂ (1 mM in indicated experiments), 1.2 mM MgCl₂, 5 mM Hepes, adjusted to pH 7.4 with NaOH, and kept in this solution during all the experiment.

Pipettes were pulled from borosilicate glass capillaries (GC150F, Clark Electromedical Instruments, England) in a P-97 pipette puller (Sutter Instruments). Membrane currents were recorded using a Heka EPC9 amplifier (Heka Elektronik, Lambrecht, Germany) interfaced to a PC computer (Dell Computer Corp, Montpellier, France). Current was sampled at 5 kHz and filtered at 2.9 kHz. Voltage-clamp protocols were implemented and data analyzed using Pulse/Pulsefit

softwares (Heka Elektronik, Lambrecht, Germany). Data are corrected for the liquid junction potential. Bi-exponential fitting of current traces was performed with the Prism software (GraphPad Software Inc., La Jolla, USA).

I_{CRAC} was mainly recorded in the whole-cell configuration using the following pipette solution: 140 mM Cs-aspartate, 2 mM $MgCl_2$, 10 mM BAPTA or EGTA according to the experiments, 10 mM Hepes, pH adjusted to 7.2 with CsOH. Typical resistance of the pipette was 10-15 M Ω . The chelation of Ca^{2+} ions by BAPTA and EGTA induced the passive depletion of the stores, and the opening of the CRAC channels (Dellis *et al.*, 2002).

Just after reaching the whole-cell configuration, the holding potential (V_H) was set to 0 mV to minimize the basal Ca^{2+} influx. The Jurkat cells had a capacitance of 6.6 ± 0.3 pF ($n > 50$). I_{CRAC} was evoked by applying a 100 ms step to -100 mV every 2 s, the current amplitude was calculated and expressed as current over cell capacitance.

At the end of all the experiments, 1 μ M $GdCl_3$ was added to inhibit I_{CRAC} . The remaining current was considered as leak current.

Chemicals

2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB), 2-aminoethoxydibutyl borate (2-ABB), diphenylboronic anhydride (DPBA), Methyl-diethylborinate (MDEB) and Trimethylborate (TMB) were from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France), thapsigargin was purchased from Calbiochem-Merck (Nottingham, UK). The structure of 2-APB and analogues is given in Figure 1.

Statistical analysis

Given values are representative of at least 3 independent experiments. A student t-test with $p < 0.05$ is considered as significant.

RESULTS

MDEB has only SOCE potentiating capacity

To visualize the SOCE, we treated the Jurkat cells with 1 μM TG in a Ca^{2+} -free HBS medium during 10 min to allow the release of Ca^{2+} ions from the ER and subsequently the opening of the SOC (**Fig. 2A**). Addition of 1 mM CaCl_2 then induced an increase of $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ due to the entry of Ca^{2+} ions through SOC (**Fig. 2A**).

In these conditions, progressive increase of the MDEB (**Fig. 1**) concentration was accompanied by an increase of the peak $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$, with a plateau for concentrations > 1 mM (**Fig. 2A and B**). Importantly, even high MDEB concentrations were devoid of any inhibition ability, allowing the calculation of an apparent potentiation constant of $\sim 40 \mu\text{M}$ (**Figs. 2A and B**). The MDEB potentiation ability peaked at $243 \pm 20 \%$ for a concentration of 1 mM, followed by a non-significantly different plateau at $216 \pm 19 \%$ for higher concentrations (**Fig. 2 B**). This MDEB - induced increase of $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ was totally abolished by 1 μM GdCl_3 , showing that MDEB acted on SOCE (**Fig. 2B**, dashed line). In view of this unexpected result, we used 2-APB and 2-ABB as controls (**Fig. 1**). As shown in **Figure 2B**, 2-APB and 2-ABB had their usual dual effects on Jurkat cell SOCE: potentiation at 3 μM ($\sim 200 \%$) and inhibition for concentration > 50 μM for 2-APB (respectively 20 μM and > 100 μM for 2-ABB).

Trimethylborate (TMB, **Fig. 1**), a molecule similar to MDEB (the two ethyl groups are replaced by two methoxyl groups) was devoid of any potentiation and inhibition capacity (**Fig. 2B**). MDEB alone did not induce calcium influx in the absence of TG (data not shown).

As $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ is an equilibrium between Ca^{2+} entries and Ca^{2+} exits, it is impossible to know directly if the increase of $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ is the result of an increased amplitude of Ca^{2+} entry or an increased Ca^{2+} extrusion. To assess this question, we next performed Fura-2 fluorescence quenching with Mn^{2+} ions. Mn^{2+} ions enter the cell through SOC, but are not pumped back to the extracellular medium. As Mn^{2+} ions quench the fluorescence of the Fura-2, an acceleration of the divalent ion entry is associated with an increase of the quenching rate. As shown in **Fig. 2C**, 1 mM MDEB increased the Fura-2 quenching rate about three fold (-0.69 ± 0.03 vs. $-0.24 \pm 0.01 \%$ / min). Thus, MDEB is able to enhance the divalent ion influx.

MDEB has kept the potentiating ability of 2-APB in other cell types

We then tested MDEB on two other cell lines. In a previous paper we had shown that 2-APB has a dual effect on SOCE from the B cell line BL-41 and from the monocytic cell line U937 (**Dellis *et al.*, 2011**).

MDEB was also able to potentiate the SOCE of these two cell lines with an apparent potentiation constant of ~ 55 and ~ 70 μM respectively for BL-41 and U937 cell lines (**Fig. 3A, B and C**). However MDEB was slightly more efficient on BL-41 and U937 cell SOCE than on Jurkat cell SOCE, respectively 328 ± 23 and 282 ± 42 vs. 243 ± 20 %.

The three cell lines express different ratio of Orai mRNA (**Dellis *et al.*, 2011**): Jurkat cells mainly expressing Orai1, BL-41 mainly Orai2-Orai1, U937 mainly Orai3-Orai2. Although BL-41 and U937 cells showed noticeable differences in their Orai mRNA expression profile compared to Jurkat cells, they have the same sensitivity to MDEB.

MDEB only potentiates the SOCE when Orai1 is expressed

Although 2-APB has a dual effect on Orai1 channels, 2-APB only potentiates Orai3 channels in over-expressing systems and in a few cell lines (**Mercer *et al.*, 2006, Motiani *et al.*, 2010**).

However, even if T cells express the three Orai isoforms, only the presence of Orai1 is requested for 2-APB to be potentiating/inhibiting on SOCE (**Dellis *et al.*, 2011**). To verify that Orai1 is the target of MDEB and not Orai3, we performed experiments in a B cell line which does not express Orai1, but expresses Orai2 and Orai3 (**Mccarl *et al.*, 2009**).

Like 2-APB (**Dellis *et al.*, 2011**), MDEB was able to increase the Mn^{2+} -induced quenching of Fura-2 only in B cells expressing Orai1 (**Fig. 3D**): this clearly showed that Orai1 expression is absolutely required for the MDEB effect on SOCE.

Competition between 2-APB and MDEB or 2-ABB and MDEB on Jurkat cell SOCE

Some experimental evidence suggests that 2-APB binds to STIM1 and other experiments suggest binding directly to Orai1. Thus, it has been hypothesized that the potentiating binding site is within the pore of the channel. As 2-APB and MDEB have similar structures, we hypothesize that they bind to the same site(s), and therefore performed competition experiments between the two

molecules. For this we used a concentration of 100 μM for both compounds. At this concentration, 2-APB is inhibiting (**Fig. 4A**, green line) and MDEB is potentiating SOCE (**Fig. 4B**, cyan line).

As clearly shown in **Figure 4A**, MDEB was not able to potentiate the SOCE in presence of 2-APB. The same result was obtained whether MDEB was added with 2-APB at the same time or not (green line vs. red line). Furthermore, when 2-APB had totally impaired the Ca^{2+} entry, MDEB could not reverse the inhibition (orange line, MDEB was added at $t = 630$ s).

In the parallel experiments, we used MDEB prior 2-APB. Clearly, when MDEB had potentiated the calcium entry, the addition of 2-APB totally inhibited any further Ca^{2+} entry and $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ rapidly returned to baseline (**Fig. 4B**, velvet line vs. cyan line). These results implied that the inhibition by 2-APB was stronger than potentiation by MDEB.

We have previously shown that the removal of the two phenyl rings of the 2-APB molecule did not impair the potentiation/inhibition capacity of the 2-ABB molecule, but just decreased the sensitivity of the SOCE to the compound (**Dellis et al., 2011**). Thus 2-ABB is less potent than 2-APB and may be less efficient in the competition with MDEB. As shown in **Figure 4C**, 100 μM 2-ABB totally inhibited the SOCE (green line). However, when the same concentration of MDEB was added at the same time as 2-ABB, the SOCE was still inhibited but only partially (red line). Thus MDEB restored $\sim 15\%$ of the $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$. When MDEB was added after 2-ABB had fully exerted its inhibitory ability, MDEB was also able to partially counteract the inhibition (orange line).

When 2-ABB was added after MDEB had exerted its potentiating effect, the SOCE was only partially inhibited (velvet line vs. cyan line, **Fig. 4D**). These results show that MDEB could partially counteract the inhibition of SOCE by 2-ABB but not 2-APB, consistent with the weaker ability of 2-ABB to inhibit the SOCE compared to 2-APB.

MDEB increases Jurkat cell I_{CRAC}

To assess the effect of MDEB on SOCE by an independent method, we performed patch-clamp experiments which allow the direct measurement of store operated calcium current, termed Ca^{2+} -Release-Activated Ca^{2+} current or I_{CRAC} . The current was activated by passive depletion of the internal stores (**Dellis et al., 2002**). Upon break-in with the pipette solution containing 10 mM BAPTA, hyperpolarization of the Jurkat cell membrane evoked a weak inward current in absence of external Ca^{2+} ions (**Fig. 5A**). Addition of 1 or 10 mM CaCl_2 induced the development of an inward current (**Fig. 5A**) which was inhibited by 1 μM GdCl_3 (**Fig. 5C and D**), 1 mM CdCl_2 or 5 mM NiCl_2 (not shown) and

showed a fast inhibition during the 100 ms pulse. The current/voltage relationships revealed an inwardly rectifying current with a reversal potential in the positive voltages (**Fig. 5E**). These kinetic and pharmacological characteristics were typical of I_{CRAC} (**Zweifach et Lewis, 1995a**).

In presence of 10 mM $CaCl_2$ in the bath, 1 mM MDEB was able to quickly increase the amplitude of I_{CRAC} by ~ 8 fold when recorded with a BAPTA-containing pipette solution (**Fig. 5B**, red trace, **Table 1**). As shown in **Figure 5C**, the general kinetics of I_{CRAC} during a -100 mV – pulse seemed not affected by 1 mM MDEB. However, when the same traces were normalized to their peak current after the leak subtraction, the typical rapid inactivation process of I_{CRAC} was substantially diminished by MDEB (**Fig. 5D**). Thus, I_{CRAC} inactivated by $62 \pm 2\%$ in absence of MDEB, but only by $20 \pm 1\%$ when 1 mM MDEB was added (**Table 1**). I_{CRAC} decayed with a biexponential time course during the -100 mV – pulse due to local calcium feedback (**Zweifach et Lewis, 1995a**). Fitting the current traces with a double exponential decay function allowed the calculation of a fast ($\tau_1 = 0.9 \pm 0.1$ ms) and a slow ($\tau_2 = 20.8 \pm 0.9$ ms) component. Addition of 1 mM MDEB induced a two-fold increase of both components ($\tau_1 = 2.0 \pm 0.2$ ms, $\tau_2 = 40.1 \pm 7.7$ ms, $p < 0.01$), explaining the weaker inactivation process. Furthermore, the action of MDEB was not voltage-dependant as there was an increase of the I_{CRAC} amplitude at all the imposed potentials (**Fig. 5E**). Furthermore, the leak current was not affected by MDEB as shown by the fact that the slope of the I/V curves were the same in positive potentials (**Fig. 5E**).

The same kind of kinetics was obtained when BAPTA was replaced by EGTA in the pipette solution, except that the increase of amplitude was lower (~ 4.5 – fold, **Table 1**) and shorter in time (**Fig. 5B**, green trace). MDEB was also able to increase the two components of the rapid inactivation (**Table 1**), but with less efficacy on the fast one (increase by 1.3-fold, **Table 1**), reducing the rapid inactivation of I_{CRAC} . As expected, this fast component of the I_{CRAC} inactivation was significantly delayed by 6-fold by the use of 10 mM BAPTA in the pipette solution instead EGTA. Furthermore, even if MDEB increased the fast component with EGTA-containing pipette solution, its value did not reach the value calculated with BAPTA-containing solution in absence of MDEB (**Table 1**).

MDEB does not inhibit ER Ca^{2+} release and sequestration

One of the main limits for the use of the 2-APB as an immunomodulator is its lack of specificity and especially the fact that it inhibits Ca^{2+} release from the ER as well as SERCA activity (**Maruyama et al., 1997**). Some 2-APB analogues have been developed with higher specificity to block the SOCE, but they are still Ca^{2+} release inhibitors (**Zhou et al., 2007, Dellis et al., 2011**).

To test the possibility that MDEB is able to inhibit the Ca^{2+} release, we pre-treated the Jurkat cells with 1 mM MDEB for 5 min. To induce the Ca^{2+} release by the ER, Jurkat cells were then treated with 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ phytohemagglutinin, allowing synthesis of IP_3 and the Ca^{2+} release (Dellis *et al.*, 2002). In Ca^{2+} -free HBS, PHA induced a rapid and transient increase of $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$: the $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ peaked at 39 ± 7 nM after ~ 2 min (Fig. 6A). When 1 mM MDEB was added 5 min prior PHA, the $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ increase was not significantly different as the curves superimposed. $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ peaked at 29 ± 4 nM after ~ 2 min. The same kind of curves was obtained with 10 mM MDEB. Thus, MDEB had no effect on the PHA-induced Ca^{2+} release by the ER.

As the response to PHA was superimposable in the absence or presence of 1 mM MDEB, it seems the ER Ca^{2+} amount was not modified by MDEB. To confirm these results, we performed the same kind of experiment in a HBS medium where all the Na^+ ions were replaced by Li^+ , and where 0.4 μM HgCl_2 was added: this protocol allows the blockade of the plasma membrane $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ exchanger (NCX) and the plasma membrane calcium ATPase (PMCA), respectively. Thus, when we added TG, Ca^{2+} ions could not be pumped back to the ER, or extruded from the cell by the PMCA and NCX, and were trapped in the cytosol (Dellis *et al.*, 2009).

As shown in figure 6B, in absence of MDEB, TG induced a rapid increase of $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$, that peaked after ~ 90 s, reaching a plateau. When we pre-treated the cells with 1 mM MDEB, TG induced the same kind of $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ increase and plateau level. Thus, the total amount of ER Ca^{2+} was not modified in presence of MDEB.

DISCUSSION

During the past decade, several effectors of the SOCE have been developed, and among them, 2-APB has interesting properties: at low concentrations, it potentiates the SOCE, at higher concentrations, it is inhibitory. However, despite these properties, 2-APB is not specific to SOCE, and is a well-established effector of other Ca^{2+} transporters: SERCA, IP_3R and some TRP channels (**Hu et al., 2004**, **Chung et al., 2004**, **Bilmen et al., 2002**, **Maruyama et al., 1997**, **Missiaen et al., 2001**, **Peppiatt et al., 2003**, **Kukkonen et al., 2001**, **Lievremont et al., 2005**).

We have recently shown that the use of 2-APB analogues can help to understand which part of the molecule is requested for the potentiation or the inhibition capacity (**Dellis et al., 2011**). Thus, the two phenyl groups seem to play a key role in the sensitivity to the molecule and the inhibition process. The ethanolamine is only relevant for the inhibition capacity, and the central bore-oxygen core (BOC) is responsible for the potentiation ability.

Here we focussed our attention on MDEB, which is a 2-APB analogue restricted to the BOC. When used on 3 distinct leukocyte cell lines, MDEB has shown unique properties: this molecule is only able to potentiate the SOCE, and totally devoid of inhibition capacity. Furthermore, unlike 2-APB, MDEB does not block the Ca^{2+} release by the IP_3R of the ER (**Dellis et al., 2011**). Noteworthy, MDEB does not modify the total amount of Ca^{2+} in the ER, suggesting that it has no effect on the SERCA. Thus, this molecule seems to have a much better selectivity for the SOCE than the other 2-APB analogues (**Suzuki et al., 2010**, **Zhou et al., 2007**).

The rapid inactivation of I_{CRAC} during hyperpolarizing pulses is a Ca^{2+} -dependent process (**Zweifach et Lewis, 1995a**). Zweifach & Lewis predicted the presence of Ca^{2+} binding sites on the CRAC channel itself, at a time the molecular nature of the channel was unknown. CRAC channels are formed by a tetramer of Orai1 protein (**Penna et al., 2008**). It has been shown that point mutations of the Orai1 channel pore enable 2-APB to gate the channel (**Peinelt et al., 2008**). Furthermore, 2-APB is able to directly enlarge the pore of the Orai3 channels. Even if the 2-APB-induced potentiating binding site is unknown, these previous results demonstrate its presence in the pore of the Orai channels.

MDEB is clearly able to delay the rapid inactivation by increasing both time components of this inactivation. As the CRAC channel is less inactivated, it could transport more Ca^{2+} ions, allowing an increase of the I_{CRAC} amplitude. However, the I_{CRAC} amplitude decreased slowly after the MDEB

addition (Fig 5B), presumably due to the remaining fast inactivation process, and to additional slow inactivation process of I_{CRAC} which is dependent on the Ca^{2+} refilling of the ER and on the activation of certain protein phosphatases (**Zweifach et Lewis, 1995b**). The amplitude of the MDEB effects were also dependent on the type of Ca^{2+} chelating agent we used: thus the potentiation effect of MDEB were larger with BAPTA in the pipette solution instead of EGTA. Indeed, the two component values of the rapid inactivation calculated with EGTA-containing pipette solution are still weaker than the one calculated with BAPTA-containing solution, even in presence of MDEB, allowing the rapid inactivation to act and to reduce the current amplitude. Thus, MDEB is able to directly impair the rapid Ca^{2+} -dependent inactivation of I_{CRAC} . Noteworthy, Prakriya & Lewis clearly showed by the same kind of kinetic analysis, that 2-APB increased the I_{CRAC} amplitude, but also accelerated the rapid inactivation (**Prakriya et Lewis, 2001**). This is a major difference between 2-APB and its analogue MDEB. Interestingly, after the authors added 40 μ M 2-APB, the I_{CRAC} amplitude transiently increased before I_{CRAC} disappeared with a time constant of 10 s (**Prakriya et Lewis, 2001**). Thus, MDEB could act like 2-APB, but without its inhibition capacity.

However MDEB is only stable in DMSO for 3-4 hours, a reasonable time to perform experiments in laboratories, but not for a use as immunomodulator. On the contrary 2-APB is a stable compound: its boron atom and the amine group form an internal B-N coordinate and the presence of the phenyl rings and this internal B-N coordinate probably play a role in the stability of the molecule. In a search to stabilize MDEB, the introduction of phenyl rings, or analogue to phenyl rings should be omitted, since borinate esters with several rings are more efficient to potentiate the SOCE at nM concentrations but are also able to inhibit the SOCE at low μ M concentrations (**Zhou et al., 2007**). The comparison of MDEB and 2-ABB reveals further structural features: 2-ABB is similar to MDEB with an ethanolamine group replacing a methyl group (the two ethyl groups are also replaced by two butyl groups, but this change probably does not play a main role in the difference of the behaviour of the two molecules). 2-ABB has the dual effect on SOCE like 2-APB (**Dellis et al., 2011**). Thus, we can conclude that the internal B-N coordinate of 2-ABB (and 2-APB) confers the inhibitory capacity. However, DMBA, a 2-APB without the ethanolamine group, and not able to form the B-N internal coordinate, is a strong inhibitor of the SOCE (**Dellis et al., 2011**). Thus, the structure function analysis of the 2-APB is complex: the BOC is an absolute requirement for the molecule to be potentiating, the phenyl groups and/or the internal B-N coordinate are required for the inhibitory capacity of the molecule. Noteworthy, we can hypothesize that 2-APB inhibits the SOCE by two ways: the phenyl rings (as in the case of DMBA) or by the internal B-N coordinate (as in the case of 2-ABB).

The advantage of MDEB is that this molecule is devoid of any rings or internal coordinate which play a role in the inhibition capacity of the borinates. Thus, it confirms that the BOC is responsible of the potentiating capacity of the borinate esters and we can hypothesize that any molecule with a BOC and without any rings or internal coordinate will have the ability to potentiate the SOCE without inhibition at higher concentration. It also confirms that the presence of rings or internal B-N coordinates plays a key role in the sensitivity of the SOCE to the modulation by the borinate esters: in fact, the number of closed structures correlates with the sensitivity of SOCE: DPBA (4 phenyl groups = 4 rings) > 2-APB (2 phenyl groups + 1 internal coordinate ~ 3 rings) > 2-ABB (1 internal coordinate ~ 1 ring) > MDEB (0 ring) (Dellis *et al.*, 2011).

Another main difference of MDEB with the ring-containing borinate esters is that this molecule is not able to inhibit the Ca^{2+} release by the ER. One of the limits of 2-APB and its analogues is this lacks of specificity between acting on Ca^{2+} release and Ca^{2+} influx. Mikoshiba's group had designed analogues with better selectivity for the Ca^{2+} influx (Zhou *et al.*, 2007, Suzuki *et al.*, 2010). However, these molecules could still inhibit Ca^{2+} release by the ER even if at high concentrations. When we used a protocol to trap all the Ca^{2+} ions of the ER in the cytosol, we were able to estimate the amount of Ca^{2+} in the ER: MDEB does not modify this amount of Ca^{2+} , which is directly dependent on the SERCA activity. Thus, even if more direct experiments on SERCA are needed, it seems that 1 mM MDEB is not able to block the SERCA activity. However, more work is needed to define the specificity of MDEB, especially its effect on TRP channels. But the present work clearly shows that one of the two main targets of 2-APB, the IP_3 receptor seems insensitive to this analogue.

In summary, we have characterized the first molecule with only a potentiating ability on SOCE from different cell lines. It has kept the potentiating ability of the parent 2-APB molecule, but lost the capacity to inhibit at higher concentrations. Thus, it could represent the first member of a promising new compound family. However, the molecule should be improved to increase its stability in solution, to be used as a new class of immune-modulator.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from the Association pour la Recherche contre le Cancer (ARC)

REFERENCES

1. M. Hoth, R. Penner, Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium current in mast cells. *Nature* **355**, 353 (Jan 23, 1992).
2. A. Zweifach, R. S. Lewis, Mitogen-regulated Ca²⁺ current of T lymphocytes is activated by depletion of intracellular Ca²⁺ stores. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 6295 (Jul 1, 1993).
3. S. Feske, C. Picard, A. Fischer, Immunodeficiency due to mutations in ORAI1 and STIM1. *Clin Immunol* **135**, 169 (Feb 26, 2010).
4. T. Maruyama, T. Kanaji, S. Nakade, T. Kanno, K. Mikoshiba, 2APB, 2-aminoethoxydiphenyl borate, a membrane-penetrable modulator of Ins(1,4,5)P₃-induced Ca²⁺ release. *J Biochem* **122**, 498 (Sep, 1997).
5. L. Missiaen, G. Callewaert, H. De Smedt, J. B. Parys, 2-Aminoethoxydiphenyl borate affects the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor, the intracellular Ca²⁺ pump and the non-specific Ca²⁺ leak from the non-mitochondrial Ca²⁺ stores in permeabilized A7r5 cells. *Cell Calcium* **29**, 111 (Feb, 2001).
6. J. P. Lievreumont, G. S. Bird, J. W. Putney, Jr., Mechanism of inhibition of TRPC cation channels by 2-aminoethoxydiphenylborane. *Mol Pharmacol* **68**, 758 (Sep, 2005).
7. H. Z. Hu *et al.*, 2-aminoethoxydiphenyl borate is a common activator of TRPV1, TRPV2, and TRPV3. *The Journal of biological chemistry* **279**, 35741 (Aug 20, 2004).
8. Y. Dobrydneva *et al.*, 2-aminoethoxydiphenyl borate as a prototype drug for a group of structurally related calcium channel blockers in human platelets. *Mol Pharmacol* **69**, 247 (Jan, 2006).
9. M. Prakriya, R. S. Lewis, Potentiation and inhibition of Ca(2+) release-activated Ca(2+) channels by 2-aminoethyl diphenyl borate (2-APB) occurs independently of IP(3) receptors. *J Physiol* **536**, 3 (Oct 1, 2001).
10. H. Zhou *et al.*, 2-Aminoethyl diphenylborinate analogues: selective inhibition for store-operated Ca²⁺ entry. *Biochem Biophys Res Commun* **352**, 277 (Jan 12, 2007).
11. A. Z. Suzuki, S. Ozaki, J. I. Goto, K. Mikoshiba, Synthesis of bisboron compounds and their strong inhibitory activity on store-operated calcium entry. *Bioorg Med Chem Lett* **20**, 1395 (Jan 11, 2010).
12. J. I. Goto *et al.*, Two novel 2-aminoethyl diphenylborinate (2-APB) analogues differentially activate and inhibit store-operated Ca(2+) entry via STIM proteins. *Cell Calcium*, (Nov 26, 2009).
13. O. Dellis, P. Mercier, C. Chomienne, The boron-oxygen core of borinate esters is responsible for the store-operated calcium entry potentiation ability. *BMC Pharmacol* **11**, 1 (Jan 26, 2011).
14. G. Grynkiewicz, M. Poenie, R. Y. Tsien, A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *The Journal of biological chemistry* **260**, 3440 (Mar 25, 1985).
15. H. Sugawara, M. Kurosaki, M. Takata, T. Kurosaki, Genetic evidence for involvement of type 1, type 2 and type 3 inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in signal transduction through the B-cell antigen receptor. *EMBO J* **16**, 3078 (Jun 2, 1997).
16. S. C. Chung, T. V. McDonald, P. Gardner, Inhibition by SK&F 96365 of Ca²⁺ current, IL-2 production and activation in T lymphocytes. *Br J Pharmacol* **113**, 861 (Nov, 1994).
17. C. Peinelt, A. Lis, A. Beck, A. Fleig, R. Penner, 2-Aminoethoxydiphenyl borate directly facilitates and indirectly inhibits STIM1-dependent gating of CRAC channels. *J Physiol* **586**, 3061 (Jul 1, 2008).

18. W. I. DeHaven, J. T. Smyth, R. R. Boyles, G. S. Bird, J. W. Putney, Jr., Complex actions of 2-aminoethyldiphenyl borate on store-operated calcium entry. *The Journal of biological chemistry* **283**, 19265 (Jul 11, 2008).
19. M. D. Bootman *et al.*, 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) is a reliable blocker of store-operated Ca²⁺ entry but an inconsistent inhibitor of InsP₃-induced Ca²⁺ release. *FASEB J* **16**, 1145 (Aug, 2002).
20. M. J. Berridge, P. Lipp, M. D. Bootman, The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**, 11 (Oct, 2000).
21. J. O. Liu, Calmodulin-dependent phosphatase, kinases, and transcriptional corepressors involved in T-cell activation. *Immunological reviews* **228**, 184 (Mar, 2009).
22. R. S. Lewis, M. D. Cahalan, Mitogen-induced oscillations of cytosolic Ca²⁺ and transmembrane Ca²⁺ current in human leukemic T cells. *Cell Regul* **1**, 99 (Nov, 1989).
23. S. Feske *et al.*, A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function. *Nature* **441**, 179 (May 11, 2006).
24. S. Feske, CRAC channelopathies. *Pflugers Arch* **460**, 417 (Jan 29, 2010).
25. J. W. Putney, Jr., New molecular players in capacitative Ca²⁺ entry. *J Cell Sci* **120**, 1959 (Jun 15, 2007).
26. Y. Gwack *et al.*, Biochemical and functional characterization of Orai proteins. *The Journal of biological chemistry* **282**, 16232 (Jun 1, 2007).
27. J. Soboloff *et al.*, Orai1 and STIM reconstitute store-operated calcium channel function. *The Journal of biological chemistry* **281**, 20661 (Jul 28, 2006).
28. A. Lis *et al.*, CRACM1, CRACM2, and CRACM3 are store-operated Ca²⁺ channels with distinct functional properties. *Curr Biol* **17**, 794 (May 1, 2007).
29. R. K. Motiani, I. F. Abdullaev, M. Trebak, A novel native store-operated calcium channel encoded by Orai3: Selective requirement of Orai3 versus Orai1 in estrogen receptor positive versus estrogen receptor negative breast cancer cells. *The Journal of biological chemistry* **285**, 19173 (Apr 15, 2010).
30. B. C. Bandyopadhyay, S. C. Pingle, G. P. Ahern, Store-operated Ca²⁺ signaling in dendritic cells occurs independently of STIM1. *J Leukoc Biol* **89**, 57 (Oct 22, 2010).
31. J. Soboloff, Y. Zhang, M. Minden, S. A. Berger, Sensitivity of myeloid leukemia cells to calcium influx blockade: application to bone marrow purging. *Exp Hematol* **30**, 1219 (Oct, 2002).
32. J. L. Farber, The role of calcium ions in toxic cell injury. *Environ Health Perspect* **84**, 107 (Mar, 1990).
33. J. G. Bilmen, L. L. Wootton, R. E. Godfrey, O. S. Smart, F. Michelangeli, Inhibition of SERCA Ca²⁺ pumps by 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB). 2-APB reduces both Ca²⁺ binding and phosphoryl transfer from ATP, by interfering with the pathway leading to the Ca²⁺-binding sites. *Eur J Biochem* **269**, 3678 (Aug, 2002).
34. M. K. Chung, H. Lee, A. Mizuno, M. Suzuki, M. J. Caterina, 2-aminoethoxydiphenyl borate activates and sensitizes the heat-gated ion channel TRPV3. *J Neurosci* **24**, 5177 (Jun 2, 2004).
35. Y. Dobrydneva, P. Blackmore, 2-Aminoethoxydiphenyl borate directly inhibits store-operated calcium entry channels in human platelets. *Mol Pharmacol* **60**, 541 (Sep, 2001).
36. O. Dellis *et al.*, Inhibition of the calcium release-activated calcium (CRAC) current in Jurkat T cells by the HIV-1 envelope protein gp160. *The Journal of biological chemistry* **277**, 6044 (Feb 22, 2002).
37. O. Dellis *et al.*, Modulation of B-cell endoplasmic reticulum calcium homeostasis by Epstein-Barr virus Latent Membrane Protein-1. *Mol Cancer* **8**, 59 (Aug 3, 2009).
38. J. C. Mercer *et al.*, Large store-operated calcium selective currents due to co-expression of Orai1 or Orai2 with the intracellular calcium sensor, Stim1. *The Journal of biological chemistry* **281**, 24979 (Aug 25, 2006).

39. C. A. McCarl *et al.*, ORAI1 deficiency and lack of store-operated Ca²⁺ entry cause immunodeficiency, myopathy, and ectodermal dysplasia. *J Allergy Clin Immunol* **124**, 1311 (Dec, 2009).
40. A. Zweifach, R. S. Lewis, Rapid inactivation of depletion-activated calcium current (ICRAC) due to local calcium feedback. *J Gen Physiol* **105**, 209 (Feb, 1995).
41. C. M. Peppiatt *et al.*, 2-Aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) antagonises inositol 1,4,5-trisphosphate-induced calcium release, inhibits calcium pumps and has a use-dependent and slowly reversible action on store-operated calcium entry channels. *Cell Calcium* **34**, 97 (Jul, 2003).
42. J. P. Kukkonen, P. E. Lund, K. E. Akerman, 2-aminoethoxydiphenyl borate reveals heterogeneity in receptor-activated Ca(2+) discharge and store-operated Ca(2+) influx. *Cell Calcium* **30**, 117 (Aug, 2001).
43. A. Penna *et al.*, The CRAC channel consists of a tetramer formed by Stim-induced dimerization of Orai dimers. *Nature* **456**, 116 (Nov 6, 2008).
44. A. Zweifach, R. S. Lewis, Slow calcium-dependent inactivation of depletion-activated calcium current. Store-dependent and -independent mechanisms. *The Journal of biological chemistry* **270**, 14445 (Jun 16, 1995).

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Structure of 2-APB and its analogues.

Structures of 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) (1), 2-aminoethoxydibutyl borate (2-ABB) (2), Methyl-diethylborinate (MDEB) (3) and Trimethylborate (TMB) (4) are depicted.

Figure 2: MDEB potentiates the divalent ion influx in Jurkat cells.

A. Cytosolic calcium concentration measurement of Jurkat cells using Fura-2 fluorescence. Cells in Ca^{2+} free HBS were treated for 10 min with 1 μM TG to allow Ca^{2+} release from ER and opening of SOC channels. After 10 min, 1 mM CaCl_2 was re-added, allowing Ca^{2+} entry through SOC channels. Different MDEB concentrations were applied 30 s prior to CaCl_2 (green arrow). Error bars were omitted for clarity (maximum $\sim \pm 50$ nM).

B. 2-APB, 2-ABB and MDEB concentrations differently regulate SOCE of Jurkat cells, when TMB is inefficient. Experiments were done as in figure 2A, borinate ester compounds were added 30 s prior to CaCl_2 . Peak $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ was expressed as % of peak $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ recorded in absence of any borinate ester compounds and plotted against the concentration of borinate compounds ($[X]$). Results are mean \pm SEM of at least 3 experiments.

C. Mn^{2+} quenching of Fura-2 in Jurkat cells stimulated by 1 mM MDEB. Cells were pre-treated for 10 min with 1 μM TG allowing Ca^{2+} release from ER and opening of SOC channels prior to the recording. 60 s after beginning of the recordings, 100 μM MnCl_2 was added. At 120 s, 1 mM MDEB was added. Fluorescence of Fura-2 was recorded at 510 nm after excitation at 360 nm. Results are representative of 3 experiments and expressed relative to the fluorescence prior to MnCl_2 addition.

Figure 3: MDEB also potentiates SOCE of BL-41 and U937 cell lines.

A and B. Cytosolic calcium was recorded in BL-41 (A) or U937 cells (B) using the protocol described in figure 2B.

C. MDEB dose-response curves for Jurkat, BL-41 and U937 cells from Figure 2B, 3A and 3B were fitted with a simple sigmoidal curve. The half-maximal increase in peak $[Ca^{2+}]_{cyt}$ (potentiation constant) was reached at $\sim 40 \mu M$ for Jurkat cells and $\sim 70 \mu M$ for BL-41 and U937 cells.

D. MDEB only potentiates the B cell line SOCE when Orai1 is expressed. Mn^{2+} quenching experiments were done as in figure 2C comparing a wildtype lymphoblastoid cells and Orai1-deficient cells. An Orai1-deficient lymphoblastoid cell line was established from a patient presenting a SCID phenotype due to a double mutation in the Orai1 gene alleles, resulting in the absence of Orai1 protein in the plasma membrane of B cells (Mccarl *et al.*, 2009).

Figure 4: MDEB partly counteracts the inhibition of the SOCE by 2-ABB, but not by 2-APB.

Cytosolic calcium concentration measurement of Jurkat cells in the presence of MDEB (A and B) and 2-APB or MDEB and 2-ABB (C and D). MDEB, 2-APB and 2-ABB were used at $100 \mu M$. Cells were treated for 600s with $1 \mu M$ TG to allow Ca^{2+} release from ER and opening of SOC channels. Then $1 mM$ $CaCl_2$ was added, allowing Ca^{2+} entry through SOC channels. 2-APB, MDEB or 2-APB + MDEB were applied 30 s prior to $CaCl_2$ (**A and B**, green arrow). In competition experiments, MDEB was applied 100 s after $CaCl_2$ addition on cells treated by 2-APB ("2-APB prior MDEB", **A**, red arrow) or 2-APB was applied 100 s after $CaCl_2$ addition on cells treated by MDEB ("MDEB prior 2-APB", **B**, red arrow). **C and D**: same as A and B, except 2-APB was replaced by 2-ABB. Error bars were omitted for clarity (maximum $\sim \pm 50 nM$).

Figure 5: MDEB directly enhances I_{CRAC} .

For patch-clamp recordings, Jurkat cells were dialyzed by a pipette solution containing $10 mM$ BAPTA (or EGTA when indicated) to induce store depletion, and the whole-cell currents were measured in the presence of extracellular Ca^{2+} .

A. I_{CRAC} was evoked by a $100 ms$ pulse at $-100 mV$ from a holding potential of $0 mV$. Whole cell current was normalized to cell capacitance. Three representative current traces from a cell in bath medium contained $0, 1$ or $10 mM$ $CaCl_2$.

B. Time courses of I_{CRAC} evoked by applying a $100 ms$ step to $-100 mV$ every $2 s$ were recorded with a pipette solution containing $10 mM$ BAPTA or $10 mM$ EGTA, in presence of $10 mM$ external $CaCl_2$. The I_{CRAC} amplitude was measured at $t = 4 ms$, to avoid contamination by the capacitance peak current. At

t = 0 min, 1 mM MDEB was directly added to the bath and I_{CRAC} amplitude immediately increased. At t = 6 min, 1 μ M $GdCl_3$ was added. The remaining Gd^{3+} - resistant current was considered as leak current and removed from the current amplitude recordings for the quantitative analyse shown in table 1.

C. Sample traces of I_{CRAC} from different points of the time course of Fig 5B, recorded in the presence of 10 mM extracellular $CaCl_2$ with a BAPTA-containing pipette: before MDEB addition (i), at the peak of MDEB potentiation (ii), after addition of 1 μ M $GdCl_3$ (iii).

D. Traces i and ii from Fig 5C were normalized to their peak current and expressed in %, showing that MDEB reduced the rapid inactivation process of I_{CRAC} .

E. Current/voltage relationships of the current recorded in presence of 10 mM $CaCl_2$ before and after 1 mM MDEB addition. Voltage was switched from 0 to -100 mV for 10 ms and then increased to +50 mV at 1mv/ms.

Figure 6: MDEB does not inhibit the Ca^{2+} release by the ER

Jurkat cytosolic concentrations were measured as in figure 2.

A. To induce Ca^{2+} release by the ER, cells were treated with 10 μ g/ml phytohemagglutinin (PHA) at t = 30 s. 1 mM MDEB was added 5 min prior PHA stimulation, which is known to induce the synthesis of IP_3 and the Ca^{2+} release through ER IP_3 receptors. Error bars were omitted for clarity but were < 4 nM. Results are representative of at least 3 experiments.

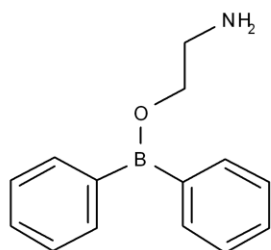
B. To estimate the total amount of Ca^{2+} of the ER, Jurkat cells were placed in a Li^+ -HBS, to impair the activity of the Na^+ - Ca^{2+} exchanger and in presence of 0.4 μ M $HgCl_2$ to block the activity of the plasma membrane Ca^{2+} ATPases. 1 mM MDEB was added 5 min prior TG stimulation to induce the Ca^{2+} release by the ER.

Table 1: MDEB modifies the kinetic properties of I_{CRAC} recorded with EGTA- or BAPTA-containing pipette solution.

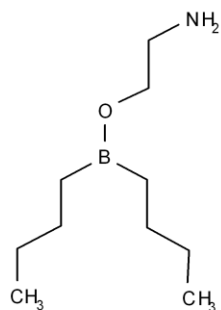
Analysis of I_{CRAC} from leak subtracted current recordings as shown in Fig 5A and 5C. The I_{CRAC} amplitude was measured at t = 4 ms, to avoid contamination by the capacitance peak current. Decay was calculated as the current amplitude difference between the "peak" current measured at t = 4 ms

and the "steady-state" measured at $t = 95$ ms. Traces were fitted with bi-exponential curves allowing the calculation of a fast and a slow component of the rapid inactivation of I_{CRAC} . Results are shown as mean \pm SEM from 5 experiments.

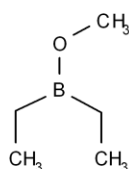
Figure 1



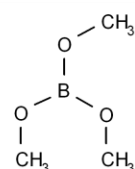
2-APB (1)



2-ABB (2)



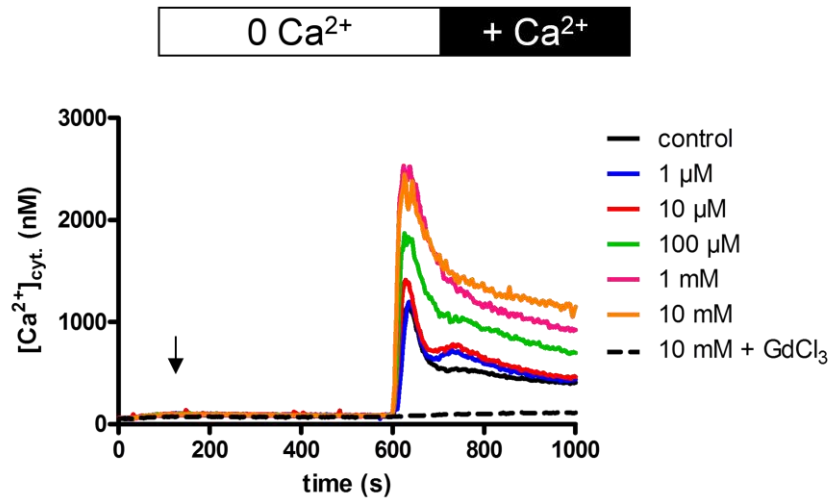
MDEB (3)



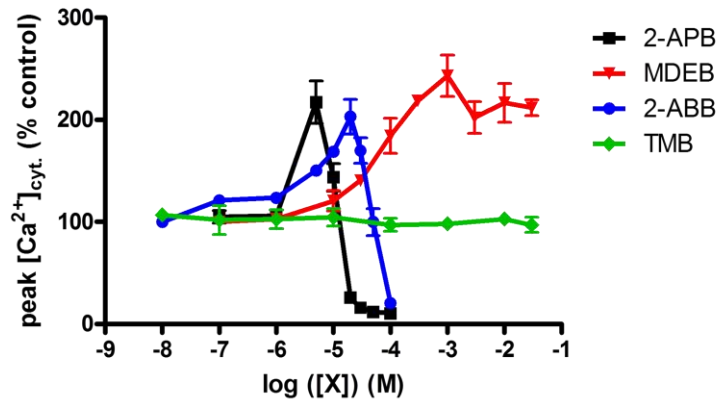
TMB (4)

Figure 2

A



B



C

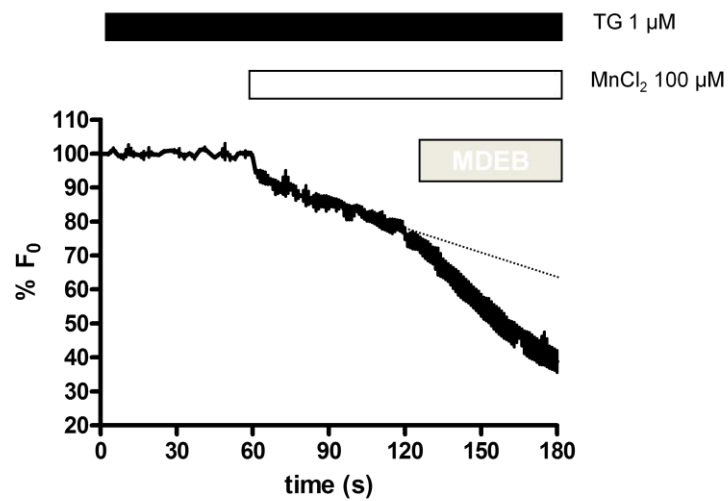


Figure 3

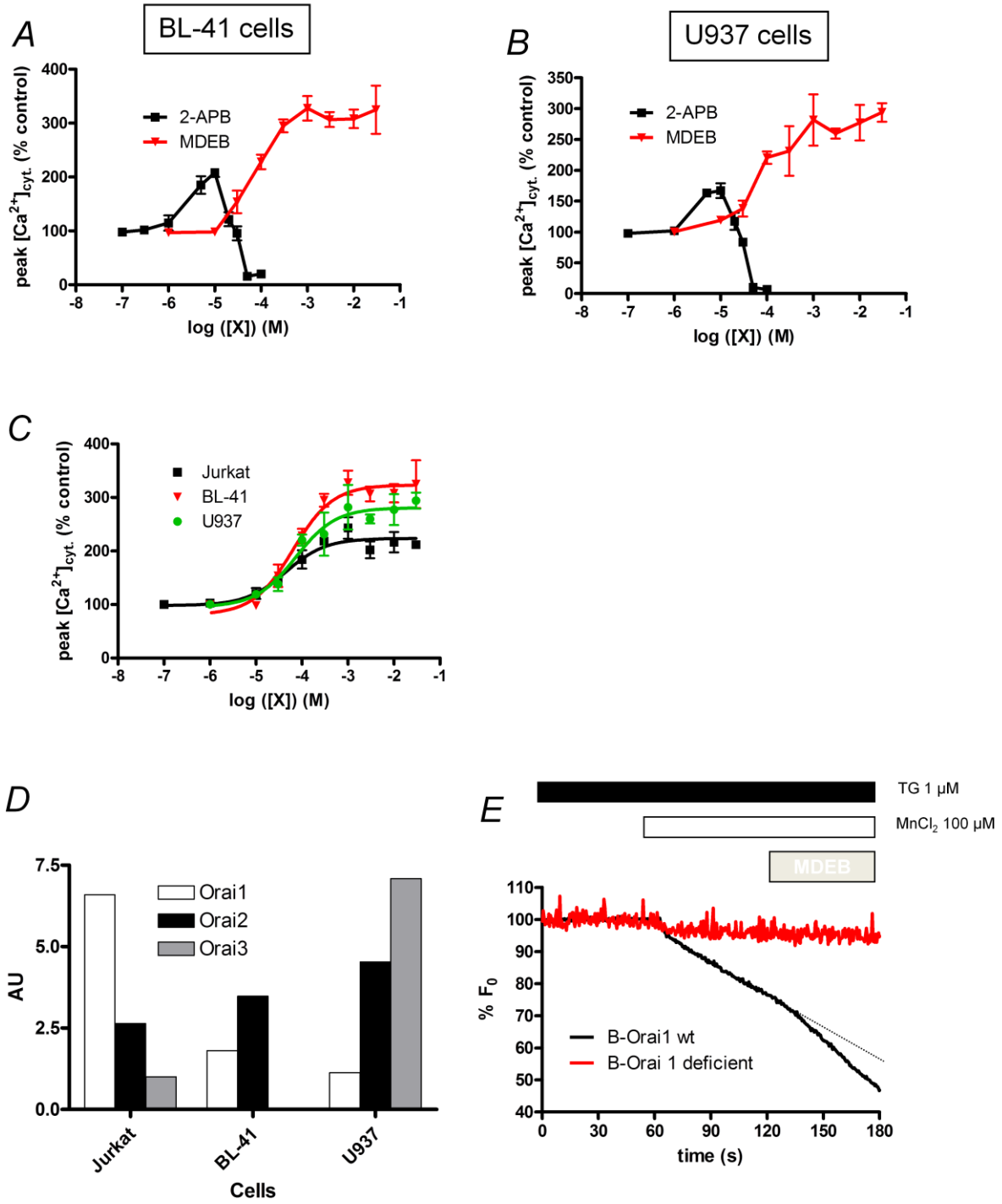
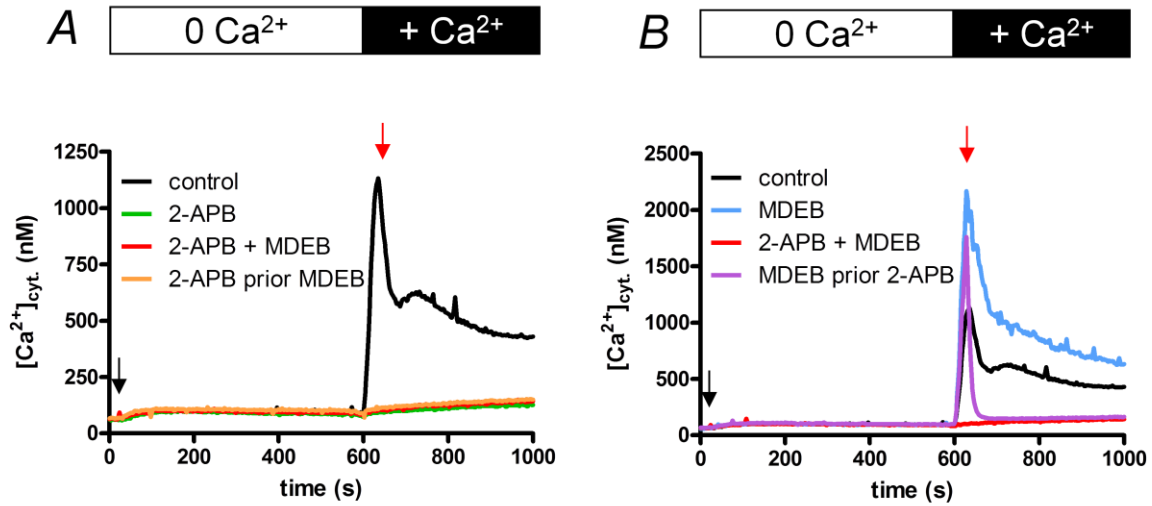


Figure 4

2-APB vs. MDEB



2-ABB vs. MDEB

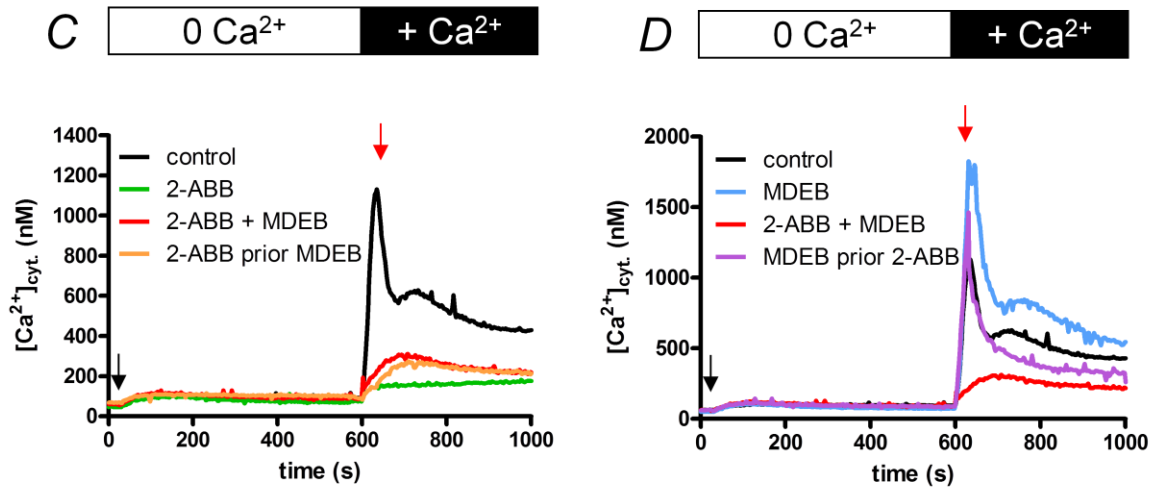


Figure 5

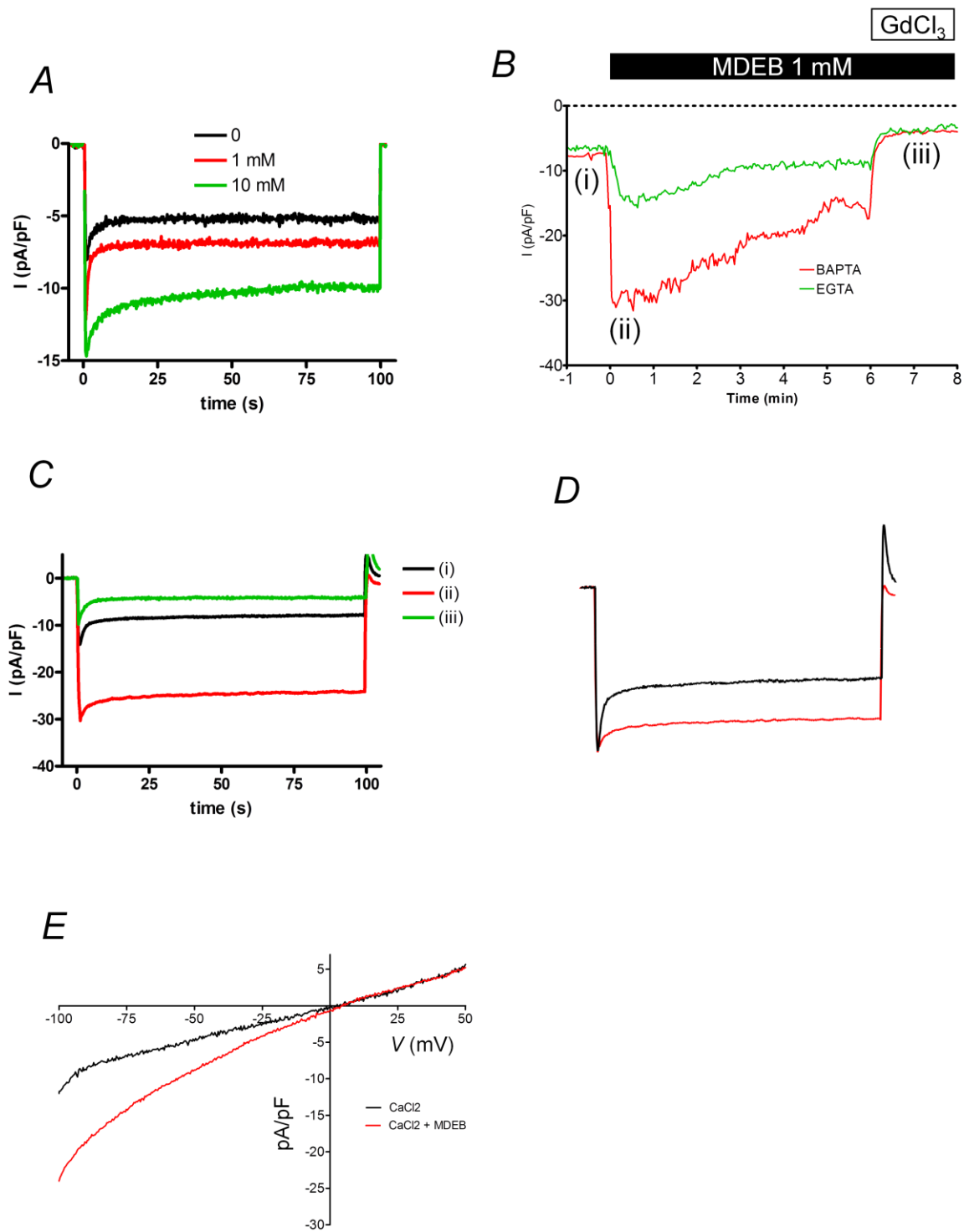
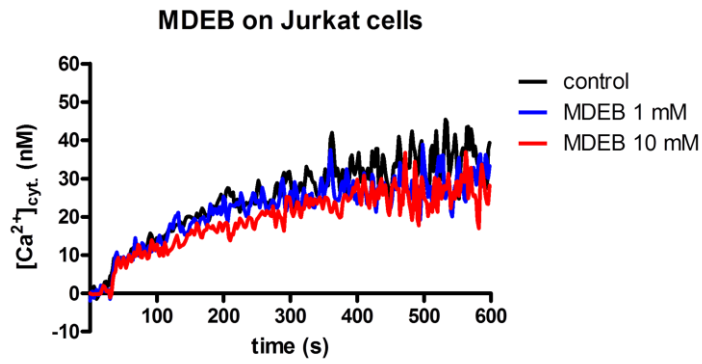


Figure 6



XXXVII. COMMUNICATIONS ORALES ET POSTERS

POSTERS:

5 MAI 2011 : *Caractérisation de nouvelles molécules inhibitrices du SOCE dans les leucocytes* au **COLLOQUE CHIMIE ET SANTE : DE LA MOLECULE AU MEDICAMENT**

Espace Adenauer, Cité internationale de Paris

11-12 MAI 2011 : *Caractérisation de nouveaux effecteurs de l'influx calcique de type SOCE dans les leucocytes* aux **6^{ème} JOURNEES DE BIOLOGIE CELLULAIRE DU GRAND CAMPUS**

Faculté des sciences, Université Paris-Sud

4 OCTOBRE 2011 : *Caractérisation de nouveaux effecteurs de l'influx calcique de type SOCE dans les leucocytes* à **LA JOURNEE DE L'ECOLE DOCTORALE ED419**

Faculté de médecine, Université Paris-Sud

COMMUNICATION ORALE :

14-15 MAI 2012 : *Effets de nouveaux analogues du 2-APB sur le Store-Operated Calcium Entry (SOCE) des lymphocytes T* aux **7^{ème} JOURNEES DE BIOLOGIE CELLULAIRE DU GRAND CAMPUS**

Faculté des sciences, Université Paris-Sud

XXXVIII. MISSION HORS-RECHERCHE ENSEIGNEMENT

BIOCHIMIE

ANNEE 2011-2012:

BIOL200 BIOCHIMIE: *TD Licence 2^{ème} année S3* Faculté des sciences, Orsay Université Paris-Sud

BIOL303 BIOLOGIE MOLECULAIRE ET BIOCHIMIE: *Cours + TD* Faculté des sciences, Orsay Université Paris-Sud

ANALYSE DES VOIES DE TRANSDUCTION DU SIGNAL: *TP Master Signalisation 1^{ère} année* Faculté des sciences, Orsay Université Paris-Sud

APOPTOSE ET SIGNALISATION: *TP Master Signalisation 1^{ère} année* Faculté des sciences, Orsay Université Paris-Sud

ANNEE 2012-2013:

BIOL200 BIOCHIMIE: *TD Licence 2^{ème} année S3* Faculté des sciences, Orsay Université Paris-Sud

BIOL303 BIOLOGIE MOLECULAIRE ET BIOCHIMIE: *Cours + TD* Faculté des sciences, Orsay Université Paris-Sud

ANALYSE DES VOIES DE TRANSDUCTION DU SIGNAL: *TP Master Signalisation 1^{ère} année* Faculté des sciences, Orsay Université Paris-Sud

BIOL311: *TP Electrophorèse Master Signalisation 1^{ère} année* Faculté des sciences, Orsay Université Paris-Sud

XXXIX. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ADEREM, A. et UNDERHILL, D. 1999. Mechanisms of Phagocytosis in Macrophages. *Annu Rev Immunol*, 17, 593-623.
- ALI H, C. S., FOREMAN JC, PEARCE FL, PIOTROWSKI W, THASTRUP O 1985. The Ability of Thapsigargin and Thapsigargin to Activate Cells Involved in the Inflammatory Response. *Br J Pharmacol*, 85, 705-12.
- AMULIC, B., CAZALET, C., HAYES, G. L., METZLER, K. D. et ZYCHLINSKY, A. 2012. Neutrophil Function: From Mechanisms to Disease. *Annu Rev Immunol*, 30, 459-89.
- BANDYOPADHYAY, B. C., PINGLE, S. C. et AHERN, G. P. 2010. Store-Operated Ca²⁺ Signaling in Dendritic Cells Occurs Independently of Stim1. *J Leukoc Biol*, 89, 57-62.
- BEECH, D. J. 2005. Emerging Functions of 10 Types of Trp Cationic Channel in Vascular Smooth Muscle. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 32, 597-603.
- BEI, L., HU, T., QIAN, Z. M. et SHEN, X. 1998. Extracellular Ca²⁺ Regulates the Respiratory Burst of Human Neutrophils. *Biochim Biophys Acta*, 1404, 475-83.
- BERRIDGE, M. J., BOOTMAN, M. D. et RODERICK, H. L. 2003. Calcium Signalling: Dynamics, Homeostasis and Remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4, 517-29.
- BERRIDGE, M. J., LIPP, P. et BOOTMAN, M. D. 2000. The Versatility and Universality of Calcium Signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 1, 11-21.
- BILMEN, J. G., WOOTTON, L. L., GODFREY, R. E., SMART, O. S. et MICHELANGELI, F. 2002. Inhibition of Serca Ca²⁺ Pumps by 2-Aminoethoxydiphenyl Borate (2-Apb). 2-Apb Reduces Both Ca²⁺ Binding and Phosphoryl Transfer from Atp, by Interfering with the Pathway Leading to the Ca²⁺-Binding Sites. *Eur J Biochem*, 269, 3678-87.
- BOOTMAN, M. D., COLLINS, T. J., MACKENZIE, L., RODERICK, H. L., BERRIDGE, M. J. et PEPIATT, C. M. 2002. 2-Aminoethoxydiphenyl Borate (2-Apb) Is a Reliable Blocker of Store-Operated Ca²⁺ Entry but an Inconsistent Inhibitor of Insp3-Induced Ca²⁺ Release. *FASEB J*, 16, 1145-50.
- BORREGAARD, N., HEIPLE, J. M., SIMONS, E. R. et CLARK, R. A. 1983. Subcellular Localization of the B-Cytochrome Component of the Human Neutrophil Microbicidal Oxidase: Translocation During Activation. *J Cell Biol*, 97, 52-61.

- BRANDMAN, O., LIU, J., PARK, W. S. et MEYER, T. 2007. Stim2 Is a Feedback Regulator That Stabilizes Basal Cytosolic and Endoplasmic Reticulum Ca(2+) Levels. *Cell*, 131, 1327-39.
- BRAUN, A., GESSNER, J. E., VARGA-SZABO, D., SYED, S. N., KONRAD, S., STEGNER, D., VOGTLE, T., SCHMIDT, R. E. et NIESWANDT, B. 2009. Stim1 Is Essential for Fcgamma Receptor Activation and Autoimmune Inflammation. *Blood*, 113, 1097-104.
- BRECHARD, S., MELCHIOR, C., PLANCON, S., SCHENTEN, V. et TSCHIRHART, E. J. 2008. Store-Operated Ca²⁺ Channels Formed by Trpc1, Trpc6 and Orai1 and Non-Store-Operated Channels Formed by Trpc3 Are Involved in the Regulation of NADPH Oxidase in HI-60 Granulocytes. *Cell Calcium*, 44, 492-506.
- BRECHARD, S., PLANCON, S., MELCHIOR, C. et TSCHIRHART, E. J. 2009. Stim1 but Not Stim2 Is an Essential Regulator of Ca²⁺ Influx-Mediated NADPH Oxidase Activity in Neutrophil-Like HI-60 Cells. *Biochem Pharmacol*, 78, 504-13.
- BROAD, L. M., BRAUN, F. J., LIEVREMONT, J. P., BIRD, G. S., KUROSAKI, T. et PUTNEY, J. W., Jr. 2001. Role of the Phospholipase C-Inositol 1,4,5-Trisphosphate Pathway in Calcium Release-Activated Calcium Current and Capacitative Calcium Entry. *J Biol Chem*, 276, 15945-52.
- BURGESS GM, G. P., McKinney JS, Berridge MJ, Irvine RF, Putney JW Jr. 1984. The Second Messenger Linking Receptor Activation to Internal Ca Release in Liver. *Nature*, 309, 63-6.
- BURGOS, R. A., CONEJEROS, I., HIDALGO, M. A., WERLING, D. et HERMOSILLA, C. 2011. Calcium Influx, a New Potential Therapeutic Target in the Control of Neutrophil-Dependent Inflammatory Diseases in Bovines. *Vet Immunol Immunopathol*, 143, 1-10.
- BYLUND, J., BROWN, K., MOVITZ, C., DAHLGREN, C. et KARLSSON, A. 2010. Intracellular Generation of Superoxide by the Phagocyte NADPH Oxidase: How, Where, and What For? *Free Radic Biol Med*, 49, 1834-45.
- CAI, S., FATHERAZI, S., PRESLAND, R. B., BELTON, C. M., ROBERTS, F. A., GOODWIN, P. C., SCHUBERT, M. M. et IZUTSU, K. T. 2006. Evidence That Trpc1 Contributes to Calcium-Induced Differentiation of Human Keratinocytes. *Pflugers Arch*, 452, 43-52.
- CALCRAFT, P. J., RUAS, M., PAN, Z., CHENG, X., ARREDOUANI, A., HAO, X., TANG, J., RIETDORF, K., TEBOUL, L., CHUANG, K. T., LIN, P., XIAO, R., WANG, C., ZHU, Y., LIN, Y., WYATT, C. N., PARRINGTON, J., MA, J., EVANS, A. M., GALIONE, A. et ZHU, M. X. 2009. NaADP Mobilizes Calcium from Acidic Organelles through Two-Pore Channels. *Nature*, 459, 596-600.
- CASSATELLA, M. A., ANEGON, I., CUTURI, M. C., GRISKEY, P., TRINCHIERI, G. et PERUSSIA, B. 1989. Fc Gamma R(Cd16) Interaction with Ligand Induces Ca²⁺ Mobilization and

- Phosphoinositide Turnover in Human Natural Killer Cells. Role of Ca²⁺ in Fc Gamma R(Cd16)-Induced Transcription and Expression of Lymphokine Genes. *J Exp Med*, 169, 549-67.
- CHEN, X., ZHONG, Z., XU, Z., CHEN, L. et WANG, Y. 2010. 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein as a Fluorescent Probe for Reactive Oxygen Species Measurement: Forty Years of Application and Controversy. *Free Radic Res*, 44, 587-604.
- CHRISTOPHE, T., KARLSSON, A., DUGAVE, C., RABIET, M. J., BOULAY, F. et DAHLGREN, C. 2001. The Synthetic Peptide Trp-Lys-Tyr-Met-Val-Met-NH₂ Specifically Activates Neutrophils through Fpr1/Lipoxin A4 Receptors and Is an Agonist for the Orphan Monocyte-Expressed Chemoattractant Receptor Fpr2. *J Biol Chem*, 276, 21585-93.
- CHUDZINSKI, M. G., CHI, Y. et TAYLOR, M. S. 2011. Borinic Acids: A Neglected Class of Organoboron Compounds for Recognition of Diols in Aqueous Solution. *Australian Journal of Chemistry*, 64, 1466-1469.
- CHUNG, M. K., LEE, H., MIZUNO, A., SUZUKI, M. et CATERINA, M. J. 2004. 2-Aminoethoxydiphenyl Borate Activates and Sensitizes the Heat-Gated Ion Channel Trpv3. *J Neurosci*, 24, 5177-82.
- CHUNG, S. C., McDONALD, T. V. et GARDNER, P. 1994. Inhibition by Sk&F 96365 of Ca²⁺ Current, IL-2 Production and Activation in T Lymphocytes. *Br J Pharmacol*, 113, 861-8.
- CONEJEROS, I., JARA, E., CARRETTA, M. D., ALARCON, P., HIDALGO, M. A. et BURGOS, R. A. 2012a. 2-Aminoethoxydiphenyl Borate (2-APB) Reduces Respiratory Burst, MMP-9 Release and CD11b Expression, and Increases L-Selectin Shedding in Bovine Neutrophils. *Res Vet Sci*, 92, 103-10.
- CONEJEROS, I., VELÁSQUEZ, Z., CARRETTA, M., ALARCÓN, P., HIDALGO, M. et BURGOS, R. 2012b. 2-Aminoethoxydiphenyl Borate (2-APB) Reduces Alkaline Phosphatase Release, CD63 Expression, F-Actin Polymerization and Chemotaxis without Affecting the Phagocytosis Activity in Bovine Neutrophils. *Vet Immunol Immunopathol*, 145, 540-5.
- CSUTORA, P., SU, Z., KIM, H., BUGRIM, A., CUNNINGHAM, K., NUCCITELLI, R. et KEIZER, J. H., MR Blalock, JE Marchase, RB. 1999. Calcium Influx Factor Is Synthesized by Yeast and Mammalian Cells Depleted of Organellar Calcium Stores. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 121-6.
- DADSETAN, S., ZAKHAROVA, L., MOLINSKI, T. F. et FOMINA, A. F. 2008. Store-Operated Ca²⁺ Influx Causes Ca²⁺ Release from the Intracellular Ca²⁺ Channels That Is Required for T Cell Activation. *J Biol Chem*, 283, 12512-9.
- DEHAVEN, W. I., JONES, B. F., PETRANKA, J. G., SMYTH, J. T., TOMITA, T., BIRD, G. S. et PUTNEY, J. W., Jr. 2009. Trpc Channels Function Independently of Stim1 and Orai1. *J Physiol*, 587, 2275-98.

- DEHAVEN, W. I., SMYTH, J. T., BOYLES, R. R., BIRD, G. S. et PUTNEY, J. W., Jr. 2008. Complex Actions of 2-Aminoethyldiphenyl Borate on Store-Operated Calcium Entry. *J Biol Chem*, 283, 19265-73.
- DELLA BIANCA, V., GRZESKOWIAK, M. et ROSSI, F. 1990. Studies on Molecular Regulation of Phagocytosis and Activation of the NADPH Oxidase in Neutrophils. IgG- and C3b-Mediated Ingestion and Associated Respiratory Burst Independent of Phospholipid Turnover and Ca²⁺ Transients. *J Immunol*, 144, 1411-7.
- DELLIS, O., ARBABIAN, A., BROULAND, J. P., KOVACS, T., ROWE, M., CHOMIENNE, C., JOAB, I. et PAPP, B. 2009. Modulation of B-Cell Endoplasmic Reticulum Calcium Homeostasis by Epstein-Barr Virus Latent Membrane Protein-1. *Mol Cancer*, 8, 59.
- DELLIS, O., GANGLOFF, S. C., PAULAIS, M., TONDELIER, D., RONA, J. P., BROUILLARD, F., BOUTEAU, F., GUENOUNOU, M. et TEULON, J. 2002. Inhibition of the Calcium Release-Activated Calcium (Crac) Current in Jurkat T Cells by the HIV-1 Envelope Protein Gp160. *J Biol Chem*, 277, 6044-50.
- DELLIS, O., MERCIER, P. et CHOMIENNE, C. 2011. The Boron-Oxygen Core of Borinate Esters Is Responsible for the Store-Operated Calcium Entry Potentiation Ability. *BMC Pharmacol*, 11, 1.
- DELMAS, P., WANAVERBEQ, N., ABOGADIE, F. C., MISTRY, M., BROWN, D. A. 2002. Signaling Microdomains Define the Specificity of Receptor-Mediated InsP(3) Pathways in Neurons. *Neuron*, 34, 209-20.
- DEMAUREX, N., LEW, D. P. et KRAUSE, K. H. 1992. Cyclopiazonic Acid Depletes Intracellular Ca²⁺ Stores and Activates an Influx Pathway for Divalent Cations in HI-60 Cells. *J Biol Chem*, 267, 2318-24.
- DEMAUREX, N., MONOD, A., LEW, D. P. et KRAUSE, K. H. 1994. Characterization of Receptor-Mediated and Store-Regulated Ca²⁺ Influx in Human Neutrophils. *Biochem J*, 297 (Pt 3), 595-601.
- DENG, X., WANG, Y., ZHOU, Y., SOBOLOFF, J. et GILL, D. L. 2009. Stim and Orai: Dynamic Intermembrane Coupling to Control Cellular Calcium Signals. *J Biol Chem*, 284, 22501-5.
- DI VIRGILIO, F., MEYER, B., GREENBERG, S. et SILVERSTEIN, S. 1988. Fc Receptor-Mediated Phagocytosis Occurs in Macrophages at Exceedingly Low Cytosolic Ca²⁺ Levels. *J Cell Biol*, 106, 657-66.
- DOBRYDNEVA, Y., ABELT, C. J., DOVEL, B., THADIGIRI, C. M., WILLIAMS, R. L. et BLACKMORE, P. F. 2006. 2-Aminoethoxydiphenyl Borate as a Prototype Drug for a Group of Structurally Related Calcium Channel Blockers in Human Platelets. *Mol Pharmacol*, 69, 247-56.

- DOBRYDNEVA, Y. et BLACKMORE, P. 2001. 2-Aminoethoxydiphenyl Borate Directly Inhibits Store-Operated Calcium Entry Channels in Human Platelets. *Mol Pharmacol*, 60, 541-52.
- FAOUZI, M., HAGUE, F., POTIER, M., AHIDOUCHE, A., SEVESTRE, H. et OUADID-AHIDOUCHE, H. 2011. Down-Regulation of Orai3 Arrests Cell-Cycle Progression and Induces Apoptosis in Breast Cancer Cells but Not in Normal Breast Epithelial Cells. *J Cell Physiol*, 226, 542-51.
- FAOUZI, M., KISCHEL, P., HAGUE, F., AHIDOUCHE, A., BENZERDJEB, N., SEVESTRE, H., PENNER, R. et OUADID-AHIDOUCHE, H. 2013. Orai3 Silencing Alters Cell Proliferation and Cell Cycle Progression Via C-Myc Pathway in Breast Cancer Cells. *Biochim Biophys Acta*, 1833, 752-60.
- FARBER, J. L. 1990. The Role of Calcium Ions in Toxic Cell Injury. *Environ Health Perspect*, 84, 107-11.
- FAURSCHEU, M. et BORREGAARD, N. 2003. Neutrophil Granules and Secretory Vesicles in Inflammation. *Microbes Infect*, 5, 1317-27.
- FESKE, S. 2007. Calcium Signalling in Lymphocyte Activation and Disease. *Nat Rev Immunol*, 7, 690-702.
- FESKE, S. 2010. Crac Channelopathies. *Pflugers Arch*, 460, 417-435.
- FESKE, S., GWACK, Y., PRAKRIYA, M., SRIKANTH, S., PUPPEL, S. H., TANASA, B., HOGAN, P. G., LEWIS, R. S., DALY, M. et RAO, A. 2006. A Mutation in Orai1 Causes Immune Deficiency by Abrogating Crac Channel Function. *Nature*, 441, 179-85.
- FESKE, S., PICARD, C. et FISCHER, A. 2010. Immunodeficiency Due to Mutations in Orai1 and Stim1. *Clin Immunol*, 135, 169-182.
- FIORIO PLA, A., MARIC, D., BRAZER, S. C., GIACOBINI, P., LIU, X., CHANG, Y. H., AMBUDKAR, I. S. et BARKER, J. L. 2005. Canonical Transient Receptor Potential 1 Plays a Role in Basic Fibroblast Growth Factor (Bfgf)/Fgf Receptor-1-Induced Ca²⁺ Entry and Embryonic Rat Neural Stem Cell Proliferation. *J Neurosci*, 25, 2687-701.
- FRANZIUS, D., HOTH, M. et PENNER, R. 1994. Non-Specific Effects of Calcium Entry Antagonists in Mast Cells. *Pflugers Arch*, 428, 433-8.
- FRISCHAUF, I., MUIK, M., DERLER, I., BERGSMANN, J., FAHRNER, M., SCHINDL, R., GROSCHNER, K. et ROMANIN, C. 2009. Molecular Determinants of the Coupling between Stim1 and Orai Channels: Differential Activation of Orai1,2,3 Channels by a Stim1 Coiled-Coil Mutant. *J Biol Chem*.

- GAO, J. L., LEE, E. J. et MURPHY, P. M. 1999. Impaired Antibacterial Host Defense in Mice Lacking the N-Formylpeptide Receptor. *J Exp Med*, 189, 657-62.
- GEISZT, M., SZEBERENYI, J. B., KALDI, K. et LIGETI, E. 1999. Role of Different Ca²⁺ Sources in the Superoxide Production of Human Neutrophil Granulocytes. *Free Radic Biol Med*, 26, 1092-9.
- GOTO, J., SUZUKI, A. Z., OZAKI, S., MATSUMOTO, N., NAKAMURA, T., EBISUI, E., FLEIG, A., PENNER, R. et MIKOSHIBA, K. 2010. Two Novel 2-Aminoethyl Diphenylborinate (2-Apb) Analogues Differentially Activate and Inhibit Store-Operated Ca(2+) Entry Via Stim Proteins. *Cell Calcium*, 47, 1-10.
- GOTO, J. I., SUZUKI, A. Z., OZAKI, S., MATSUMOTO, N., NAKAMURA, T., EBISUI, E., FLEIG, A., PENNER, R. et MIKOSHIBA, K. 2009. Two Novel 2-Aminoethyl Diphenylborinate (2-Apb) Analogues Differentially Activate and Inhibit Store-Operated Ca(2+) Entry Via Stim Proteins. *Cell Calcium*.
- GREENBERG, S., EL KHOURY, J., DI VIRGILIO, F., KAPLAN, E. et SILVERSTEIN, S. 1991. Ca²⁺-Independent F-Actin Assembly and Disassembly During Fc Receptor-Mediated Phagocytosis in Mouse Macrophages. *J Cell Biol*, 113, 757-67.
- GREGORY, R., RYCHKOV G et GJ, B. 2001. Evidence That 2-Aminoethyl Diphenylborate Is a Novel Inhibitor of Store-Operated Ca²⁺ Channels in Liver Cells, and Acts through a Mechanism Which Does Not Involve Inositol Trisphosphate Receptors. *Biochem J*, 354, 285-90.
- GRONDAHL, G., JOHANNISSON, A., JENSEN-WAERN, M. et NILSSON EKDAHL, K. 2001. Opsonization of Yeast Cells with Equine I_c3b, C3b, and I_gg. *Vet Immunol Immunopathol*, 80, 209-23.
- GRYNKIEWICZ, G., POENIE, M. et TSIEN, R. Y. 1985. A New Generation of Ca²⁺ Indicators with Greatly Improved Fluorescence Properties. *J Biol Chem*, 260, 3440-50.
- GWACK, Y., SRIKANTH, S., FESKE, S., CRUZ-GUILLOTY, F., OH-HORA, M., NEEMS, D. S., HOGAN, P. G. et RAO, A. 2007. Biochemical and Functional Characterization of Orai Proteins. *J Biol Chem*, 282, 16232-43.
- HALLETT, M. B., DAVIES, E. V. et CAMPBELL, A. K. 1990. Oxidase Activation in Individual Neutrophils Is Dependent on the Onset and Magnitude of the Ca²⁺ Signal. *Cell Calcium*, 11, 655-63.
- HEINER, I., EISEL, J. et LUCKHOFF, A. 2003. Role and Regulation of Trp Channels in Neutrophil Granulocytes. *Cell Calcium*, 33, 533-40.

- HIDE, M. et BEAVEN, M. A. 1991. Calcium Influx in a Rat Mast Cell (Rbl-2h3) Line. Use of Multivalent Metal Ions to Define Its Characteristics and Role in Exocytosis. *J Biol Chem*, 266, 15221-9.
- HISHIKAWA, T., CHEUNG, J., YELAMARTY, R. et KNUTSON, D. 1991. Calcium Transients During Fc Receptor-Mediated and Nonspecific Phagocytosis by Murine Peritoneal Macrophages. *J Cell Biol*, 115, 59-66.
- HOGAN, P. G., LEWIS, R. S. et RAO, A. 2010. Molecular Basis of Calcium Signaling in Lymphocytes: Stim and Orai. *Annu Rev Immunol*, 28, 491-533.
- HOTH, M. et PENNER, R. 1992. Depletion of Intracellular Calcium Stores Activates a Calcium Current in Mast Cells. *Nature*, 355, 353-6.
- HOTH, M. et PENNER, R. 1993. Calcium Release-Activated Calcium Current in Rat Mast Cells. *J Physiol*, 465, 359-86.
- HOU, X., PEDI, L., DIVER, M. M. et LONG, S. B. 2012. Crystal Structure of the Calcium Release-Activated Calcium Channel Orai. *Science*, 338, 1308-13.
- HSU, S., O'CONNELL, P. J., KLYACHKO, V. A., BADMINTON, M. N., THOMSON, A. W., JACKSON, M. B., CLAPHAM, D. E. et AHERN, G. P. 2001. Fundamental Ca²⁺ Signaling Mechanisms in Mouse Dendritic Cells: Crac Is the Major Ca²⁺ Entry Pathway. *J Immunol*, 166, 6126-33.
- HU, H. Z., GU, Q., WANG, C., COLTON, C. K., TANG, J., KINOSHITA-KAWADA, M., LEE, L. Y., WOOD, J. D. et ZHU, M. X. 2004. 2-Aminoethoxydiphenyl Borate Is a Common Activator of Trpv1, Trpv2, and Trpv3. *J Biol Chem*, 279, 35741-8.
- IMBODEN, J. B. et STOBO, J. D. 1985. Transmembrane Signalling by the T Cell Antigen Receptor. Perturbation of the T3-Antigen Receptor Complex Generates Inositol Phosphates and Releases Calcium Ions from Intracellular Stores. *J Exp Med*, 161, 446-56.
- ISHIKAWA, J., OHGA, K., YOSHINO, T., TAKEZAWA, R., ICHIKAWA, A., KUBOTA, H. et YAMADA, T. 2003. A Pyrazole Derivative, Ym-58483, Potently Inhibits Store-Operated Sustained Ca²⁺ Influx and Il-2 Production in T Lymphocytes. *J Immunol*, 170, 4441-9.
- IWASAKI, H., Y., M., Y., H., K., U., H., Z. et K., M. 2001. 2-Aminoethoxydiphenyl Borate (2-Apb) Inhibits Capacitative Calcium Entry Independently of the Function of Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptors. *Receptors Channels*, 7, 429-39.
- JACKSON TR, P. S., Thastrup O, Hanley MR 1988. A Novel Tumour Promoter, Thapsigargin, Transiently Increases Cytoplasmic Free Ca²⁺ without Generation of Inositol Phosphates in G115-4011 Neuronal Cells. *Biochem J*, 253.

- Ji, W., XU, P., LI, Z., LU, J., LIU, L., ZHAN, Y., CHEN, Y., HILLE, B., XU, T. et CHEN, L. 2008. Functional Stoichiometry of the Unitary Calcium-Release-Activated Calcium Channel. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 13668-73.
- KANKAANRANTA, H., MOILANEN, E., LINDBERG, K. et VAPAATALO, H. 1995. Pharmacological Control of Human Polymorphonuclear Leukocyte Degranulation by Fenamates and Inhibitors of Receptor-Mediated Calcium Entry and Protein Kinase C. *Biochem Pharmacol*, 50, 197-203.
- KHALFI, F., GRESSIER, B., BRUNET, C., DINE, T., LUYCKX, M., CAZIN, M. et CAZIN, J. C. 1996. Involvement of the Extracellular Calcium in the Release of Elastase and the Human Neutrophils Oxidative Burst. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 42, 1211-8.
- KLEBANOFF, S. J., KETTLE, A. J., ROSEN, H., WINTERBOURN, C. C. et NAUSEEF, W. M. 2013. Myeloperoxidase: A Front-Line Defender against Phagocytosed Microorganisms. *J Leukoc Biol*, 93, 185-98.
- KOBAYASHI, T., ROBINSON, J. M. et SEGUCHI, H. 1998. Identification of Intracellular Sites of Superoxide Production in Stimulated Neutrophils. *J Cell Sci*, 111 (Pt 1), 81-91.
- KOLACZKOWSKA, E. et KUBES, P. 2013. Neutrophil Recruitment and Function in Health and Inflammation. *Nat Rev Immunol*, 13, 159-75.
- KOVACS, G., MONTALBETTI, N., SIMONIN, A., DANKO, T., BALAZS, B., ZSEMBERY, A. et HEDIGER, M. A. 2012. Inhibition of the Human Epithelial Calcium Channel Trpv6 by 2-Aminoethoxydiphenyl Borate (2-App). *Cell Calcium*, 52, 468-80.
- KUKKONEN, J. P., LUND, P. E. et AKERMAN, K. E. 2001. 2-Aminoethoxydiphenyl Borate Reveals Heterogeneity in Receptor-Activated Ca(2+) Discharge and Store-Operated Ca(2+) Influx. *Cell Calcium*, 30, 117-29.
- LAMBETH, J. D. 2004. Nox Enzymes and the Biology of Reactive Oxygen. *Nat Rev Immunol*, 4, 181-9.
- LE, Y., GONG, W., LI, B., DUNLOP, N. M., SHEN, W., SU, S. B., YE, R. D. et WANG, J. M. 1999. Utilization of Two Seven-Transmembrane, G Protein-Coupled Receptors, Formyl Peptide Receptor-Like 1 and Formyl Peptide Receptor, by the Synthetic Hexapeptide Wkymvm for Human Phagocyte Activation. *J Immunol*, 163, 6777-84.
- LE, Y., LI, B., GONG, W., SHEN, W., HU, J., DUNLOP, N. M., OPPENHEIM, J. J. et WANG, J. M. 2000. Novel Pathophysiological Role of Classical Chemotactic Peptide Receptors and Their Communications with Chemokine Receptors. *Immunol Rev*, 177, 185-94.

- LE, Y., OPPENHEIM, J. J. et WANG, J. M. 2001. Pleiotropic Roles of Formyl Peptide Receptors. *Cytokine Growth Factor Rev*, 12, 91-105.
- LE, Y., YANG, Y., CUI, Y., YAZAWA, H., GONG, W., QIU, C. et WANG, J. M. 2002. Receptors for Chemotactic Formyl Peptides as Pharmacological Targets. *Int Immunopharmacol*, 2, 1-13.
- LEE, H., SUH, B. C. et KIM, K. T. 1997. Feedback Regulation of Atp-Induced Ca²⁺ Signaling in HL-60 Cells Is Mediated by Protein Kinase α - and C-Mediated Changes in Capacitative Ca²⁺ Entry. *J Biol Chem*, 272, 21831-8.
- LEE, Y. M., KIM, B. J., KIM, H. J., YANG, D. K., ZHU, M. H., LEE, K. P., SO, I. et KIM, K. W. 2003. Trpc5 as a Candidate for the Nonselective Cation Channel Activated by Muscarinic Stimulation in Murine Stomach. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 284, G604-16.
- LEW, D., ANDERSSON, T., HED, J., DI VIRGILIO, F., POZZAN, T. et STENDAHL, O. 1985. Ca²⁺-Dependent and Ca²⁺-Independent Phagocytosis in Human Neutrophils. *Nature*, 315, 509-11.
- LEWIS, R. S. et CAHALAN, M. D. 1989. Mitogen-Induced Oscillations of Cytosolic Ca²⁺ and Transmembrane Ca²⁺ Current in Human Leukemic T Cells. *Cell Regul*, 1, 99-112.
- LI, M., JIANG, J. et YUE, L. 2006. Functional Characterization of Homo- and Heteromeric Channel Kinases Trpm6 and Trpm7. *J Gen Physiol*, 127, 525-37.
- LIEVREMONT, J. P., BIRD, G. S. et PUTNEY, J. W., Jr. 2005. Mechanism of Inhibition of Trpc Cation Channels by 2-Aminoethoxydiphenylborane. *Mol Pharmacol*, 68, 758-62.
- LIU, J., FIVAZ, M., INOUE, T. et MEYER, T. 2007. Live-Cell Imaging Reveals Sequential Oligomerization and Local Plasma Membrane Targeting of Stromal Interaction Molecule 1 after Ca²⁺ Store Depletion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 9301-6.
- LIU, J., KIM, M. L., HEO, W. D., JONES, J. T., MYERS, J. W., FERRELL, J. E., Jr. et MEYER, T. 2005. Stim Is a Ca²⁺ Sensor Essential for Ca²⁺-Store-Depletion-Triggered Ca²⁺ Influx. *Curr Biol*, 15, 1235-41.
- LIS, A., PEINELT, C., BECK, A., PARVEZ, S., MONTEILH-ZOLLER, M., FLEIG, A. et PENNER, R. 2007. Cracm1, Cracm2, and Cracm3 Are Store-Operated Ca²⁺ Channels with Distinct Functional Properties. *Curr Biol*, 17, 794-800.
- LIU, J. O. 2009. Calmodulin-Dependent Phosphatase, Kinases, and Transcriptional Corepressors Involved in T-Cell Activation. *Immunol Rev*, 228, 184-98.

- LIU, X., WANG, W., SINGH, B. B., LOCKWICH, T., JADLOWIEC, J., O'CONNELL, B., WELLNER, R., ZHU, M. X. et AMBUDKAR, I. S. 2000. Trp1, a Candidate Protein for the Store-Operated Ca²⁺ Influx Mechanism in Salivary Gland Cells. *J Biol Chem*, 275, 3403-11.
- LUIK, R. M., WU, M. M., BUCHANAN, J. et LEWIS, R. S. 2006. The Elementary Unit of Store-Operated Ca²⁺ Entry: Local Activation of Crac Channels by Stim1 at Er-Plasma Membrane Junctions. *J Cell Biol*, 174, 815-25.
- MA, H. T., PATTERSON, R. L., VAN ROSSUM, D. B., BIRNBAUMER, L., MIKOSHIBA, K. et GILL, D. L. 2000. Requirement of the Inositol Trisphosphate Receptor for Activation of Store-Operated Ca²⁺ Channels. *Science*, 287, 1647-51.
- MA, H. T., VENKATACHALAM, K., LI, H. S., MONTELL, C., KUROSAKI, T., PATTERSON, R. L. et GILL, D. L. 2001. Assessment of the Role of the Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor in the Activation of Transient Receptor Potential Channels and Store-Operated Ca²⁺ Entry Channels. *J Biol Chem*, 276, 18888-96.
- MARUYAMA, T., KANAJI, T., NAKADE, S., KANNO, T. et MIKOSHIBA, K. 1997. 2apb, 2-Aminoethoxydiphenyl Borate, a Membrane-Penetrable Modulator of Ins(1,4,5)P₃-Induced Ca²⁺ Release. *J Biochem*, 122, 498-505.
- MASON, M. J., MAYER, B. et HYMEL, L. J. 1993. Inhibition of Ca²⁺ Transport Pathways in Thymic Lymphocytes by Econazole, Miconazole, and Skf 96365. *Am J Physiol*, 264, C654-62.
- MCCARL, C. A., PICARD, C., KHALIL, S., KAWASAKI, T., ROTHER, J., PAPOLOS, A., KUTOK, J., HIVROZ, C., LEDEIST, F., PLOGMANN, K., EHL, S., NOTHEIS, G., ALBERT, M. H., BELOHRADSKY, B. H., KIRSCHNER, J., RAO, A., FISCHER, A. et FESKE, S. 2009. Orai1 Deficiency and Lack of Store-Operated Ca²⁺ Entry Cause Immunodeficiency, Myopathy, and Ectodermal Dysplasia. *J Allergy Clin Immunol*, 124, 1311-1318.
- MCNEIL, P., SWANSON, J., WRIGHT, S., SILVERSTEIN, S. et TAYLOR, D. 1986. Fc-Receptor-Mediated Phagocytosis Occurs in Macrophages without an Increase in Average [Ca⁺⁺]. *J Cell Biol*, 102, 1586-92.
- MEISSNER, G. 1994. Ryanodine Receptor/Ca²⁺ Release Channels and Their Regulation by Endogenous Effectors. *Annu Rev Physiol*, 56, 485-508.
- MERCER, J. C., DEHAVEN, W. I., SMYTH, J. T., WEDEL, B., BOYLES, R. R., BIRD, G. S. et PUTNEY, J. W., Jr. 2006. Large Store-Operated Calcium Selective Currents Due to Co-Expression of Orai1 or Orai2 with the Intracellular Calcium Sensor, Stim1. *J Biol Chem*, 281, 24979-90.
- MERRITT, J. E., ARMSTRONG, W. P., BENHAM, C. D., HALLAM, T. J., JACOB, R., JAXA-CHAMIEC, A., LEIGH, B. K., MCCARTHY, S. A., MOORES, K. E. et RINK, T. J. 1990. Sk&F 96365, a Novel Inhibitor of Receptor-Mediated Calcium Entry. *Biochem J*, 271, 515-22.

- MIGNEN, O., THOMPSON, J. L. et SHUTTLEWORTH, T. J. 2008. Orai1 Subunit Stoichiometry of the Mammalian Crac Channel Pore. *J Physiol*.
- MINKE, B. et COOK, B. 2002. Trp Channel Proteins and Signal Transduction. *Physiol Rev*, 82, 429-72.
- MISSIAEN, L., CALLEWAERT, G., DE SMEDT, H. et PARYS, J. B. 2001. 2-Aminoethoxydiphenyl Borate Affects the Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor, the Intracellular Ca²⁺ Pump and the Non-Specific Ca²⁺ Leak from the Non-Mitochondrial Ca²⁺ Stores in Permeabilized A7r5 Cells. *Cell Calcium*, 29, 111-6.
- MONTERO, M., ALVAREZ, J. et GARCIA-SANCHO, J. 1991. Agonist-Induced Ca²⁺ Influx in Human Neutrophils Is Secondary to the Emptying of Intracellular Calcium Stores. *Biochem J*, 277 (Pt 1), 73-9.
- MONTERO, M., GARCIA-SANCHO, J. et ALVAREZ, J. 1993a. Inhibition of the Calcium Store-Operated Calcium Entry Pathway by Chemotactic Peptide and by Phorbol Ester Develops Gradually and Independently Along Differentiation of HL60 Cells. *J Biol Chem*, 268, 26911-9.
- MONTERO, M., GARCIA-SANCHO, J. et ALVAREZ, J. 1993b. Transient Inhibition by Chemotactic Peptide of a Store-Operated Ca²⁺ Entry Pathway in Human Neutrophils. *J Biol Chem*, 268, 13055-61.
- MORI, Y., WAKAMORI, M., MIYAKAWA, T., HERMOSURA, M., HARA, Y., NISHIDA, M., HIROSE, K., MIZUSHIMA, A., KUROSAKI, M., MORI, E., GOTOH, K., OKADA, T., FLEIG, A., PENNER, R., IINO, M. et KUROSAKI, T. 2002. Transient Receptor Potential 1 Regulates Capacitative Ca(2+) Entry and Ca(2+) Release from Endoplasmic Reticulum in B Lymphocytes. *J Exp Med*, 195, 673-81.
- MOTIANI, R. K., ABDULLAEV, I. F. et TREBAK, M. 2010. A Novel Native Store-Operated Calcium Channel Encoded by Orai3: Selective Requirement of Orai3 Versus Orai1 in Estrogen Receptor Positive Versus Estrogen Receptor Negative Breast Cancer Cells. *J Biol Chem*, 285, 19173-19183.
- MUIK, M., FAHRNER, M., DERLER, I., SCHINDL, R., BERGSMANN, J., FRISCHAUF, I., GROSCHNER, K. et ROMANIN, C. 2009. A Cytosolic Homomerization and a Modulatory Domain within Stim1 C Terminus Determine Coupling to Orai1 Channels. *J Biol Chem*, 284, 8421-6.
- NG, J., FREDHOLM, B. B. et JONDAL, M. 1987. Studies on the Calcium Dependence of Human Nk Cell Killing. *Biochem Pharmacol*, 36, 3943-9.
- NORWOOD, N., MOORE, T. M., DEAN, D. A., BHATTACHARJEE, R., LI, M. et STEVENS, T. 2000. Store-Operated Calcium Entry and Increased Endothelial Cell Permeability. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 279, L815-24.

- NUNES, P., CORNUT, D., BOCHET, V., HASLER, U., OH-HORA, M., WALDBURGER, J. M. et DEMAUREX, N. 2012. Stim1 Juxtaposes Er to Phagosomes, Generating Ca(2)(+) Hotspots That Boost Phagocytosis. *Curr Biol*, 22, 1990-7.
- NUNES, P. et DEMAUREX, N. 2010. The Role of Calcium Signaling in Phagocytosis. *J Leukoc Biol*, 88, 57-68.
- PAREKH, A. B. 2010. Store-Operated Crac Channels: Function in Health and Disease. *Nat Rev Drug Discov*, 9, 399-410.
- PAREKH, A. B. et PUTNEY, J. W., Jr. 2005. Store-Operated Calcium Channels. *Physiol Rev*, 85, 757-810.
- PARK, C. Y., HOOVER, P. J., MULLINS, F. M., BACHHAWAT, P., COVINGTON, E. D., RAUNSER, S., WALZ, T., GARCIA, K. C., DOLMETSCH, R. E. et LEWIS, R. S. 2009. Stim1 Clusters and Activates Crac Channels Via Direct Binding of a Cytosolic Domain to Orai1. *Cell*, 136, 876-90.
- PARVEZ, S., BECK, A., PEINELT, C., SOBOLOFF, J., LIS, A., MONTEILH-ZOLLER, M., GILL, D. L., FLEIG, A. et PENNER, R. 2008. Stim2 Protein Mediates Distinct Store-Dependent and Store-Independent Modes of Crac Channel Activation. *FASEB J*, 22, 752-61.
- PEDRUZZI, E., FAY, M., ELBIM, C., GAUDRY, M. et GOUGEROT-POCIDALO, M. A. 2002. Differentiation of Plb-985 Myeloid Cells into Mature Neutrophils, Shown by Degranulation of Terminally Differentiated Compartments in Response to N-Formyl Peptide and Priming of Superoxide Anion Production by Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor. *Br J Haematol*, 117, 719-26.
- PEINELT, C., LIS, A., BECK, A., FLEIG, A. et PENNER, R. 2008. 2-Aminoethoxydiphenyl Borate Directly Facilitates and Indirectly Inhibits Stim1-Dependent Gating of Crac Channels. *J Physiol*, 586, 3061-73.
- PENNA, A., DEMURO, A., YEROMIN, A. V., ZHANG, S. L., SAFRINA, O., PARKER, I. et CAHALAN, M. D. 2008. The Crac Channel Consists of a Tetramer Formed by Stim-Induced Dimerization of Orai Dimers. *Nature*, 456, 116-20.
- PENNER, R. 1988. Multiple Signaling Pathways Control Stimulus-Secretion Coupling in Rat Peritoneal Mast Cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85, 9856-60.
- PEPPIATT, C. M., COLLINS, T. J., MACKENZIE, L., CONWAY, S. J., HOLMES, A. B., BOOTMAN, M. D., BERRIDGE, M. J., SEO, J. T. et RODERICK, H. L. 2003. 2-Aminoethoxydiphenyl Borate (2-Apb) Antagonises Inositol 1,4,5-Trisphosphate-Induced Calcium Release, Inhibits Calcium Pumps and Has a Use-Dependent and Slowly Reversible Action on Store-Operated Calcium Entry Channels. *Cell Calcium*, 34, 97-108.

- PRAKRIYA, M., FESKE, S., GWACK, Y., SRIKANTH, S., RAO, A. et HOGAN, P. G. 2006. Orai1 Is an Essential Pore Subunit of the Crac Channel. *Nature*, 443, 230-3.
- PRAKRIYA, M. et LEWIS, R. S. 2001. Potentiation and Inhibition of Ca(2+) Release-Activated Ca(2+) Channels by 2-Aminoethyldiphenyl Borate (2-Apb) Occurs Independently of Ip(3) Receptors. *J Physiol*, 536, 3-19.
- PROSSNITZ, E. R. 1997. Desensitization of N-Formylpeptide Receptor-Mediated Activation Is Dependent Upon Receptor Phosphorylation. *J Biol Chem*, 272, 15213-9.
- PROSSNITZ, E. R. et YE, R. D. 1997. The N-Formyl Peptide Receptor: A Model for the Study of Chemoattractant Receptor Structure and Function. *Pharmacol Ther*, 74, 73-102.
- PUTNEY, J. J. 1990 Capacitative Calcium Entry Revisited. *Cell Calcium*, 11, 611-24.
- PUTNEY, J. W. 1986. A Model for Receptor-Regulated Calcium Entry. *Cell Calcium*, 7, 1-12.
- PUTNEY, J. W. 2010. Pharmacology of Store-Operated Calcium Channels. *Mol Interv*, 10, 209-18.
- PUTNEY, J. W., Jr. 2007. New Molecular Players in Capacitative Ca²⁺ Entry. *J Cell Sci*, 120, 1959-65.
- QUEHENBERGER, O., PROSSNITZ, E. R., CAVANAGH, S. L., COCHRANE, C. G. et YE, R. D. 1993. Multiple Domains of the N-Formyl Peptide Receptor Are Required for High-Affinity Ligand Binding. Construction and Analysis of Chimeric N-Formyl Peptide Receptors. *J Biol Chem*, 268, 18167-75.
- QUINN, M. T., DELEO, F. R. et BOKOCH, G. M. 2007. Neutrophil Methods and Protocols. Preface. *Methods Mol Biol*, 412, vii-viii.
- RAMSEY, I. S., DELLING, M. et CLAPHAM, D. E. 2006. An Introduction to Trp Channels. *Annu Rev Physiol*, 68, 619-47.
- RANDRIAMAMPITA, C. et TSIEN, R. Y. 1993. Emptying of Intracellular Ca²⁺ Stores Releases a Novel Small Messenger That Stimulates Ca²⁺ Influx. *Nature*, 364, 809-14.
- RAO, J. N., PLATOSHYN, O., GOLOVINA, V. A., LIU, L., ZOU, T., MARASA, B. S., TURNER, D. J., YUAN, J. X. et WANG, J. Y. 2006. Trpc1 Functions as a Store-Operated Ca²⁺ Channel in Intestinal Epithelial Cells and Regulates Early Mucosal Restitution after Wounding. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 290, G782-92.
- RIOS, E. et BRUM, G. 1987. Involvement of Dihydropyridine Receptors in Excitation-Contraction Coupling in Skeletal Muscle. *Nature*, 325, 717-20.

- Roos, J. 2005. Stim1, an Essential and Conserved Component of Store-Operated Ca²⁺ Channel Function. *J Cell Biol*, 169, 435-45.
- ROSS, P. E. et CAHALAN, M. D. 1995. Ca²⁺ Influx Pathways Mediated by Swelling or Stores Depletion in Mouse Thymocytes. *J Gen Physiol*, 106, 415-44.
- SAITOH, M., ISHIKAWA, T., MATSUSHIMA, S., NAKA, M. et HIDAHA, H. 1987. Selective Inhibition of Catalytic Activity of Smooth Muscle Myosin Light Chain Kinase. *J Biol Chem*, 262, 7796-801.
- SALMON, M. D. et AHLUWALIA, J. 2010a. Actions of Calcium Influx Blockers in Human Neutrophils Support a Role for Receptor-Operated Calcium Entry. *Cell Immunol*, 262, 6-10.
- SALMON, M. D. et AHLUWALIA, J. 2010b. Discrimination between Receptor- and Store-Operated Ca(2+) Influx in Human Neutrophils. *Cell Immunol*, 265, 1-5.
- SANDOVAL, A. J., RIQUELME, J. P., CARRETTA, M. D., HANCKE, J. L., HIDALGO, M. A. et BURGOS, R. A. 2007. Store-Operated Calcium Entry Mediates Intracellular Alkalinization, Erk1/2, and Akt/Pkb Phosphorylation in Bovine Neutrophils. *J Leukoc Biol*, 82, 1266-77.
- SCHNEIDER, M. F. et CHANDLER, W. K. 1973. Voltage Dependent Charge Movement of Skeletal Muscle: A Possible Step in Excitation-Contraction Coupling. *Nature*, 242, 244-6.
- SCHNEIDER, U., SCHWENK, H. U. et BORNKAMM, G. 1977. Characterization of Ebv-Genome Negative "Null" and "T" Cell Lines Derived from Children with Acute Lymphoblastic Leukemia and Leukemic Transformed Non-Hodgkin Lymphoma. *Int J Cancer*, 19, 621-6.
- SCHORR, W., SWANDULLA, D. et ZEILHOFER, H. 1999. Mechanisms of Il-8-Induced Ca²⁺ Signaling in Human Neutrophil Granulocytes. *Eur J Immunol*, 29, 897-904.
- SCRIMGEOUR, N., LITJENS, T., MA, L., BARRITT, G. J. et RYCHKOV, G. Y. 2009. Properties of Orai1 Mediated Store-Operated Current Depend on the Expression Levels of Stim1 and Orai1 Proteins. *J Physiol*, 587, 2903-2918.
- SEO, J. K., CHOI, S. Y., KIM, Y., BAEK, S. H., KIM, K. T., CHAE, C. B., LAMBETH, J. D., SUH, P. G. et RYU, S. H. 1997. A Peptide with Unique Receptor Specificity: Stimulation of Phosphoinositide Hydrolysis and Induction of Superoxide Generation in Human Neutrophils. *J Immunol*, 158, 1895-901.
- SMALLWOOD, J. I., GUGI, B. et RASMUSSEN, H. 1988. Regulation of Erythrocyte Ca²⁺ Pump Activity by Protein Kinase C. *J Biol Chem*, 263, 2195-202.

- SMANI, T., ZAKHAROV, S. I., CSUTORA, P., LENO, E., TREPAKOVA, E. S. et BOLOTINA, V. M. 2004. A Novel Mechanism for the Store-Operated Calcium Influx Pathway. *Nat Cell Biol*, 6, 113-20.
- SMYTH, J. T., DEHAVEN, W. I., BIRD, G. S. et PUTNEY, J. W., Jr. 2008. Ca²⁺-Store-Dependent and -Independent Reversal of Stim1 Localization and Function. *J Cell Sci*, 121, 762-72.
- SOBOLOFF, J., ROTHBERG, B. S., MADESH, M. et GILL, D. L. 2012. Stim Proteins: Dynamic Calcium Signal Transducers. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 13, 549-65.
- SOBOLOFF, J., SPASSOVA, M. A., TANG, X. D., HEWAVITHARANA, T., XU, W. et GILL, D. L. 2006. Orai1 and Stim Reconstitute Store-Operated Calcium Channel Function. *J Biol Chem*, 281, 20661-5.
- SOBOLOFF, J., ZHANG, Y., MINDEN, M. et BERGER, S. A. 2002. Sensitivity of Myeloid Leukemia Cells to Calcium Influx Blockade: Application to Bone Marrow Purging. *Exp Hematol*, 30, 1219-26.
- SPLETTSTOESSER, W. D. et SCHUFF-WERNER, P. 2002. Oxidative Stress in Phagocytes--"the Enemy Within". *Microsc Res Tech*, 57, 441-55.
- STATHOPOULOS, P. B., LI, G. Y., PLEVIN, M. J., AMES, J. B. et IKURA, M. 2006. Stored Ca²⁺ Depletion-Induced Oligomerization of Stromal Interaction Molecule 1 (Stim1) Via the Ef-Sam Region: An Initiation Mechanism for Capacitive Ca²⁺ Entry. *J Biol Chem*, 281, 35855-62.
- STEINCKWICH, N., FRIPPIAT, J. P., STASIA, M. J., ERARD, M., BOXIO, R., TANKOSIC, C., DOIGNON, I. et NUSSE, O. 2007. Potent Inhibition of Store-Operated Ca²⁺ Influx and Superoxide Production in HL60 Cells and Polymorphonuclear Neutrophils by the Pyrazole Derivative Btp2. *J Leukoc Biol*, 81, 1054-64.
- STEINCKWICH, N., SCHENTEN, V., MELCHIOR, C., BRECHARD, S. et TSCHIRHART, E. J. 2011. An Essential Role of Stim1, Orai1, and S100a8-A9 Proteins for Ca²⁺ Signaling and Fc{Gamma}R-Mediated Phagosomal Oxidative Activity. *J Immunol*.
- STREB H, B. E., Haase W, Irvine RF, Schulz I 1984. Effect of Inositol-1,4,5-Trisphosphate on Isolated Subcellular Fractions of Rat Pancreas. *J Membr Biol*, 81, 241-53.
- STREB H, I. R., Berridge MJ, Schulz I 1983. Release of Ca²⁺ from a Nonmitochondrial Intracellular Store in Pancreatic Acinar Cells by Inositol-1,4,5-Trisphosphate. *Nature*, 306, 67-9.
- SU Z, B. D., Csutora P, Chang T, Shoemaker RL, Marchase RB, Blalock JE 2003. Regulation of Ca²⁺ Release-Activated Ca²⁺ Channels by Inad and Ca²⁺ Influx Factor. *Am J Physiol Cell Physiol*, 284, C497-505.

- SU, Z., CSUTORA, P., HUNTON, D., SHOEMAKER, R. L., MARCHASE, R. B. et BLALOCK, J. E. 2001. A Store-Operated Nonselective Cation Channel in Lymphocytes Is Activated Directly by Ca^{2+} Influx Factor and Diacylglycerol. *Am J Physiol Cell Physiol*, 280, C1284-92.
- SUGAWARA, H., KUROSAKI, M., TAKATA, M. et KUROSAKI, T. 1997. Genetic Evidence for Involvement of Type 1, Type 2 and Type 3 Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptors in Signal Transduction through the B-Cell Antigen Receptor. *EMBO J*, 16, 3078-88.
- SUZUKI, A. Z., OZAKI, S., GOTO, J. I. et MIKOSHIBA, K. 2010. Synthesis of Bisboron Compounds and Their Strong Inhibitory Activity on Store-Operated Calcium Entry. *Bioorg Med Chem Lett*, 20, 1395-1398.
- SWEENEY, Z. K., MINATTI, A., BUTTON, D. C. et PATRICK, S. 2009. Small-Molecule Inhibitors of Store-Operated Calcium Entry. *ChemMedChem*.
- TAKEI, M., URASHIMA, H., ENDO, K. et MURAMATU, M. 1989. Role of Calcium in Histamine Release from Rat Mast Cells Activated by Various Secretagogues; Intracellular Calcium Mobilization Correlates with Histamine Release. *Biol Chem Hoppe Seyler*, 370, 1-10.
- TAKEMURA H, H. A., Thastrup O, Putney JW Jr 1989a. Activation of Calcium Entry by the Tumor Promoter Thapsigargin in Parotid Acinar Cells. Evidence That an Intracellular Calcium Pool and Not an Inositol Phosphate Regulates Calcium Fluxes at the Plasma Membrane. *J Biol Chem*, 264, 12266-71.
- TAKEMURA H, P. J. J. 1989b. Capacitative Calcium Entry in Parotid Acinar Cells. *Biochem J*, 258, 409-12.
- TAKEZAWA, R., CHENG, H., BECK, A., ISHIKAWA, J., LAUNAY, P., KUBOTA, H., KINET, J. P., FLEIG, A., YAMADA, T. et PENNER, R. 2006. A Pyrazole Derivative Potently Inhibits Lymphocyte Ca^{2+} Influx and Cytokine Production by Facilitating Transient Receptor Potential Melastatin 4 Channel Activity. *Mol Pharmacol*, 69, 1413-20.
- TARLOWE, M. H., KANNAN, K. B., ITAGAKI, K., ADAMS, J. M., LIVINGSTON, D. H. et HAUSER, C. J. 2003. Inflammatory Chemoreceptor Cross-Talk Suppresses Leukotriene B4 Receptor 1-Mediated Neutrophil Calcium Mobilization and Chemotaxis after Trauma. *J Immunol*, 171, 2066-73.
- THASTRUP O, C. P., Drøbak BK, Hanley MR, Dawson AP 1990. Thapsigargin, a Tumor Promoter, Discharges Intracellular Ca^{2+} Stores by Specific Inhibition of the Endoplasmic Reticulum Ca^{2+} -ATPase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87, 2466-70.
- THOMAS, D. et HANLEY, M. R. 1995. Evaluation of Calcium Influx Factors from Stimulated Jurkat T-Lymphocytes by Microinjection into *Xenopus* Oocytes. *J Biol Chem*, 270, 6429-32.

- TOGASHI, K., INADA, H. et TOMINAGA, M. 2008. Inhibition of the Transient Receptor Potential Cation Channel Trpm2 by 2-Aminoethoxydiphenyl Borate (2-Apb). *Br J Pharmacol*, 153, 1324-30.
- TORNQUIST, K. 1993. Activation of Calcium Entry by Cyclopiazonic Acid in Thyroid FRTL-5 Cells. *Cell Calcium*, 14, 411-7.
- TREBAK, M., BIRD, G. S., MCKAY, R. R. et PUTNEY, J. W., Jr. 2002. Comparison of Human Trpc3 Channels in Receptor-Activated and Store-Operated Modes. Differential Sensitivity to Channel Blockers Suggests Fundamental Differences in Channel Composition. *J Biol Chem*, 277, 21617-23.
- TREBAK M, V. G., Bird GS, Putney JW Jr 2003. The Trpc3/6/7 Subfamily of Cation Channels. *Cell Calcium*, 33, 451-61.
- TREPAKOVA, E. S., CSUTORA, P., HUNTON, D. L., MARCHASE, R. B., COHEN, R. A. et BOLOTINA, V. M. 2000. Calcium Influx Factor Directly Activates Store-Operated Cation Channels in Vascular Smooth Muscle Cells. *J Biol Chem*, 275, 26158-63.
- TREVILLYAN, J. M., CHIOU, X. G., CHEN, Y. W., BALLARON, S. J., SHEETS, M. P., SMITH, M. L., WIEDEMAN, P. E., WARRIOR, U., WILKINS, J., GUBBINS, E. J., GAGNE, G. D., FAGERLAND, J., CARTER, G. W., LULY, J. R., MOLLISON, K. W. et DJURIC, S. W. 2001. Potent Inhibition of Nfat Activation and T Cell Cytokine Production by Novel Low Molecular Weight Pyrazole Compounds. *J Biol Chem*, 276, 48118-26.
- TSIEN, R. Y., POZZAN, T. et RINK, T. J. 1982. T-Cell Mitogens Cause Early Changes in Cytoplasmic Free Ca²⁺ and Membrane Potential in Lymphocytes. *Nature*, 295, 68-71.
- TUCKER, K. A., LILLY, M. B., HECK, L., Jr. et RADO, T. A. 1987. Characterization of a New Human Diploid Myeloid Leukemia Cell Line (Plb-985) with Granulocytic and Monocytic Differentiating Capacity. *Blood*, 70, 372-8.
- UNDERHILL, D. et OZINSKY, A. 2002. Phagocytosis of Microbes: Complexity in Action. *Annu Rev Immunol*, 20, 825-52.
- VIG, M., BECK, A., BILLINGSLEY, J. M., LIS, A., PARVEZ, S., PEINELT, C., KOOMOA, D. L., SOBOLOFF, J., GILL, D. L., FLEIG, A., KINET, J. P. et PENNER, R. 2006. Cracm1 Multimers Form the Ion-Selective Pore of the Crac Channel. *Curr Biol*, 16, 2073-9.
- VIG, M., Peinelt C, Beck A, Koomoa DL, Rabah D, Koblan-Huberson M, Kraft S, Turner H, Fleig A, Penner R, Kinet JP 2006. Cracm1 Is a Plasma Membrane Protein Essential for Store-Operated Ca²⁺ Entry. *Science*, 312, 1220-3.

- VOETS, T., PRENEN, J., FLEIG, A., VENNEKENS, R., WATANABE, H., HOENDEROP, J. G., BINDELS, R. J., DROOGMANS, G., PENNER, R. et NILIUS, B. 2001. Cat1 and the Calcium Release-Activated Calcium Channel Manifest Distinct Pore Properties. *J Biol Chem*, 276, 47767-70.
- WATANABE, H., TAKAHASHI, R., ZHANG, X. X., GOTO, Y., HAYASHI, H., ANDO, J., ISSHIKI, M., SETO, M., HIDAKA, H., NIKI, I. et OHNO, R. 1998. An Essential Role of Myosin Light-Chain Kinase in the Regulation of Agonist- and Fluid Flow-Stimulated Ca²⁺ Influx in Endothelial Cells. *FASEB J*, 12, 341-8.
- WILLIAMS, R. T., MANJI, S. S., PARKER, N. J., HANCOCK, M. S., VAN STEKELENBURG, L., EID, J. P., SENIOR, P. V., KAZENWADEL, J. S., SHANDALA, T., SAINT, R., SMITH, P. J. et DZIADEK, M. A. 2001. Identification and Characterization of the Stim (Stromal Interaction Molecule) Gene Family: Coding for a Novel Class of Transmembrane Proteins. *Biochem J*, 357, 673-85.
- WRIGHT, H. L., MOOTS, R. J., BUCKNALL, R. C. et EDWARDS, S. W. 2010. Neutrophil Function in Inflammation and Inflammatory Diseases. *Rheumatology (Oxford)*, 49, 1618-31.
- YE, R. D., CAVANAGH, S. L., QUEHENBERGER, O., PROSSNITZ, E. R. et COCHRANE, C. G. 1992. Isolation of a Cdna That Encodes a Novel Granulocyte N-Formyl Peptide Receptor. *Biochem Biophys Res Commun*, 184, 582-9.
- YEROMIN, A. V., ZHANG, S. L., JIANG, W., YU, Y., SAFRINA, O. et CAHALAN, M. D. 2006. Molecular Identification of the Crac Channel by Altered Ion Selectivity in a Mutant of Orai. *Nature*, 443, 226-9.
- YOUNG, J., KO, S. et COHN, Z. 1984. The Increase in Intracellular Free Calcium Associated with Igg Gamma 2b/Gamma 1 Fc Receptor-Ligand Interactions: Role in Phagocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 81, 5430-4.
- YUAN, J. P., ZENG, W., DORWART, M. R., CHOI, Y. J., WORLEY, P. F. et MUALLEM, S. 2009. Soar and the Polybasic Stim1 Domains Gate and Regulate Orai Channels. *Nat Cell Biol*, 11, 337-43.
- ZAGRANICHNAYA, T. K., WU, X. et VILLEREAU, M. L. 2005. Endogenous Trpc1, Trpc3, and Trpc7 Proteins Combine to Form Native Store-Operated Channels in Hek-293 Cells. *J Biol Chem*, 280, 29559-69.
- ZHANG, S. L., KOZAK, J. A., JIANG, W., YEROMIN, A. V., CHEN, J., YU, Y., PENNA, A., SHEN, W., CHI, V. et CAHALAN, M. D. 2008. Store-Dependent and -Independent Modes Regulating Ca²⁺ Release-Activated Ca²⁺ Channel Activity of Human Orai1 and Orai3. *J Biol Chem*, 283, 17662-71.
- ZHANG, S. L., YEROMIN, A. V., ZHANG, X. H., YU, Y., SAFRINA, O., PENNA, A., ROOS, J., STAUDERMAN, K. A. et CAHALAN, M. D. 2006. Genome-Wide Rnai Screen of Ca(2+) Influx Identifies

- Genes That Regulate Ca²⁺ Release-Activated Ca²⁺ Channel Activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 9357-62.
- ZHANG, S. L., YU, Y., ROOS, J., KOZAK, J. A., DEERINCK, T. J., ELLISMAN, M. H., STAUDERMAN, K. A. et CAHALAN, M. D. 2005. Stim1 Is a Ca²⁺ Sensor That Activates Crac Channels and Migrates from the Ca²⁺ Store to the Plasma Membrane. *Nature*, 437, 902-5.
- ZHOU, H., IWASAKI, H., NAKAMURA, T., NAKAMURA, K., MARUYAMA, T., HAMANO, S., OZAKI, S., MIZUTANI, A. et MIKOSHIBA, K. 2007. 2-Aminoethyl Diphenylborinate Analogues: Selective Inhibition for Store-Operated Ca²⁺ Entry. *Biochem Biophys Res Commun*, 352, 277-82.
- ZITT, C., STRAUSS, B., SCHWARZ, E. C., SPAETH, N., RAST, G., HATZELMANN, A. et HOTH, M. 2004. Potent Inhibition of Ca²⁺ Release-Activated Ca²⁺ Channels and T-Lymphocyte Activation by the Pyrazole Derivative Btp2. *J Biol Chem*, 279, 12427-37.
- ZOU, W., MENG, X., CAI, C., ZOU, M., TANG, S., CHU, X., WANG, X. et ZOU, F. 2012. Store-Operated Ca²⁺ Entry (Soce) Plays a Role in the Polarization of Neutrophil-Like HI-60 Cells by Regulating the Activation of Akt, Src, and Rho Family Gtpases. *Cell Physiol Biochem*, 30, 221-37.
- ZWEIFACH, A. et LEWIS, R. S. 1993. Mitogen-Regulated Ca²⁺ Current of T Lymphocytes Is Activated by Depletion of Intracellular Ca²⁺ Stores. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, 6295-9.
- ZWEIFACH, A. et LEWIS, R. S. 1995a. Rapid Inactivation of Depletion-Activated Calcium Current (I_{crac}) Due to Local Calcium Feedback. *J Gen Physiol*, 105, 209-26.
- ZWEIFACH, A. et LEWIS, R. S. 1995b. Slow Calcium-Dependent Inactivation of Depletion-Activated Calcium Current. Store-Dependent and -Independent Mechanisms. *J Biol Chem*, 270, 14445-51.

XL. ANNEXE TABLEAUX ET FIGURES

Tableau 1. Nomenclature chimique des analogues du 2-APB

Tableau 2. Récapitulatif des effets des analogues du 2-APB sur le SOCE, $InsP_3Rs$ et la synthèse de l'IL-2 dans les cellules Jurkat.

| | |
|---|----|
| <i>Figure 1.</i> Le recrutement du neutrophile au site de l'inflammation..... | 17 |
| <i>Figure 2.</i> Activation et assemblage de la NADPH oxydase..... | 21 |
| <i>Figure 3.</i> Activation des récepteurs et influx calcique dans les neutrophiles..... | 26 |
| <i>Figure 4.</i> Signalisation calcique cellulaire..... | 29 |
| <i>Figure 5.</i> Propriétés biophysiques du I_{CRAC} | 32 |
| <i>Figure 6.</i> Structure de Orai1..... | 38 |
| <i>Figure 7.</i> Structure de STIM1..... | 40 |
| <i>Figure 8.</i> Etapes d'activation d'Orai1..... | 41 |
| <i>Figure 9.</i> Structure du ML-9..... | 43 |
| <i>Figure 10.</i> Structure du BTP2..... | 44 |
| <i>Figure 11.</i> Structure du SKF-96365..... | 45 |
| <i>Figure 12.</i> Structure du 2-APB..... | 45 |
| <i>Figure 13.</i> Les différentes formes de 2-APB..... | 47 |
| <i>Figure 14.</i> Effet biphasique du 2-APB sur le I_{CRAC} | 48 |
| <i>Figure 15.</i> Structures du DPB162-AE et DPB163-AE..... | 49 |
| <i>Figure 16.</i> Protocole de mesure de l'influx capacitif calcique de type SOCE..... | 56 |
| <i>Figure 17.</i> Structure du 2-APB et ses analogues..... | 59 |
| <i>Figure 18.</i> Protocole de mesure de la libération de Ca^{2+} à partir du RE..... | 60 |
| <i>Figure 19.</i> Préparation du DCFH ₂ et son oxydation..... | 64 |
| <i>Figure 20.</i> Etapes pour mesurer la phagocytose et la production des FRO..... | 68 |
| <i>Figure 21.</i> Séparation des deux populations de levures et de cellules PLB-985 différenciées..... | 69 |
| <i>Figure 22.</i> Mesure de l'intensité de la fluorescence (Alexa Fluor 405)..... | 70 |
| <i>Figure 23.</i> Principe de la chimiluminescence avec le luminol..... | 72 |
| <i>Figure 24.</i> Principe de mesure des peroxydes avec l'Amplex UltraRed..... | 73 |
| <i>Figure 25.</i> Effets de 2-APB sur l'influx calcique SOCE des cellules Jurkat..... | 77 |
| <i>Figure 26.</i> Courbe dose-réponse (CDR) de l'effet du 2-APB sur l'influx SOCE des cellules Jurkat..... | 77 |
| <i>Figure 27.</i> Effet du Dimethoxy-APB sur l'influx SOCE des cellules Jurkat..... | 79 |
| <i>Figure 28.</i> Courbe dose-réponse de l'effet du Methoxy-APB et du Dimethoxy-APB sur l'influx calcique SOCE des cellules Jurkat..... | 79 |

| | |
|--|-----|
| Figure 29. Effet du Cyclic-APB sur l'influx SOCE des cellules Jurkat | 80 |
| Figure 30. Courbe dose-réponse de l'effet du Cyclic-APB sur l'influx calcique SOCE des cellules Jurkat | 81 |
| Figure 31. Effet du Benzothienyl-APB sur l'influx calcique SOCE des Jurkat | 82 |
| Figure 32. Courbe dose-réponse de l'effet du Benzothienyl-APB sur l'influx calcique de type SOCE des cellules Jurkat..... | 82 |
| Figure 33. Effet du Thienyl-APB sur l'influx SOCE des cellules Jurkat | 83 |
| Figure 34. Courbe dose-réponse de l'effet du Thienyl-APB sur l'influx calcique SOCE des cellules Jurkat | 83 |
| Figure 35. Effet du MDEB sur l'influx SOCE des cellules Jurkat | 85 |
| Figure 36. Courbe dose-réponse de l'effet du MDEB sur l'influx calcique SOCE des cellules Jurkat | 85 |
| Figure 37. Le Methoxy-APB et le Dimethoxy-APB inhibent la libération du Ca^{2+} à partir du RE..... | 87 |
| Figure 38. Le Cyclic-APB et le benzothienyl-APB inhibent la libération du Ca^{2+} | 88 |
| Figure 39. Le Thienyl-APB inhibe la libération du Ca^{2+} | 88 |
| Figure 40. Le MDEB n'affecte pas l'InsP ₃ R..... | 89 |
| Figure 41. Parmi les analogues du 2-APB testés seul le MDEB n'a pas d'effet sur la libération du Ca^{2+} à partir du RE | 90 |
| Figure 42. Effet du MDEB 1 mM sur le I _{CRAC} | 92 |
| Figure 43. Effets des analogues du 2-APB sur la synthèse de l'IL-2..... | 93 |
| Figure 44. le MDEB à concentrations croissantes inhibe la synthèse de l'IL-2 dans les cellules Jurkat stimulées..... | 94 |
| Figure 45. Le MDEB induit une mort cellulaire par apoptose dans les cellules Jurkat stimulées..... | 95 |
| Figure 46. Courbe dose-réponse de l'effet du 2-APB sur le SOCE des cellules PLB-985 différenciées en phagocytes..... | 97 |
| Figure 47. Courbe dose-réponse de l'effet du 2-APB sur l'influx Ca^{2+} induit par le fMLF..... | 98 |
| Figure 48. Courbe dose-réponse de l'effet du 2-APB sur l'influx Ca^{2+} induit par le WKYMVm | 99 |
| Figure 49. Une comparaison entre l'influx Ca^{2+} suite aux différents stimuli | 100 |
| Figure 50. Comparaison de l'influx du Ba^{2+} dans les PLB-985 différenciées suite aux différentes stimulations | 101 |
| Figure 51. Comparaison des surfaces sous les courbes des influx du Ba^{2+} après 400 s | 102 |
| Figure 52. Comparaison de l'influx du Manganèse après différents traitements de cellules | 103 |
| Figure 53. Comparaison des pentes de l'influx Mn^{2+} | 103 |

| | |
|---|-----|
| <i>Figure 54. Effets du Benzothienyl-APB et du MDEB sur l'influx SOCE des PLB-985 différenciées induit par la Tg.....</i> | 104 |
| <i>Figure 55. Effet du Benzothienyl-APB et du MDEB sur l'influx SOCE induit par le fMLF</i> | 105 |
| <i>Figure 56. Effets du MDEB et du Benzothienyl-APB sur l'influx du Mn²⁺</i> | 106 |
| <i>Figure 57. Comparaison des pentes de l'influx Mn²⁺</i> | 107 |
| <i>Figure 58. Effet du MDEB et du benzothienyl-APB sur l'influx du Mn²⁺ après stimulation des cellules PLB-985 différenciées avec le WKYMVm.....</i> | 108 |
| <i>Figure 59. Comparaison des pentes d'influx du Mn²⁺ après stimulation des cellules avec le WKYMVm</i> | 108 |
| <i>Figure 60. Effet du MDEB et du Benzothienyl-APB sur l'influx Mn²⁺ après un traitement à la Tg.....</i> | 109 |
| <i>Figure 61. Comparaison des pentes de l'influx Mn²⁺ des composés MDEB et Benzothienyl-APB après traitement à la Tg.....</i> | 109 |
| <i>Figure 62. Effets du MDEB et du Benzothienyl-APB sur la phagocytose des levures S.cerevisiae par les PLB-985 différenciées.....</i> | 111 |
| <i>Figure 63. Représentation des intensités de fluorescence moyenne d'Alexa Fluor 405</i> | 111 |
| <i>Figure 64. Effet du Benzothienyl-APB et du MDEB sur la production des FRO dans les cellules PLB-985 différenciées</i> | 112 |
| <i>Figure 65. Effets du Benzothienyl-APB sur la production de FRO.....</i> | 114 |
| <i>Figure 66. Comparaison des surfaces sous les courbes de l'effet du Benzothienyl-APB sur la production de FRO.....</i> | 114 |
| <i>Figure 67. Le SKF-96365 inhibe partiellement la production de FRO dans les PLB-985</i> | 115 |
| <i>Figure 68. Comparaison des surfaces sous les courbes de l'effet du SKF-96365 sur la production de FRO.....</i> | 116 |
| <i>Figure 69. Les cellules traitées par le 2-APB à 5µM ne produisent que peu de FRO.....</i> | 117 |
| <i>Figure 70. Comparaison des surfaces sous les courbes de l'effet du 2-APB 5µM sur la production de FRO.....</i> | 117 |
| <i>Figure 71. Le 2-APB à 100 µM supprime complètement la production de FRO</i> | 118 |
| <i>Figure 72. Comparaison des surfaces sous les courbes de l'effet du 2-APB 5µM sur la production de FRO.....</i> | 118 |
| <i>Figure 73. Effet du MDEB sur la production de FRO par les cellules PLB-985</i> | 119 |
| <i>Figure 74. Le MDEB seul augmente le signal de chimiluminescence.....</i> | 119 |
| <i>Figure 75. Effet du benzothienyl-APB sur la production de FRO induite par le PMA 200 nM</i> | 121 |
| <i>Figure 76. Effet du 2-APB à 5 µM sur les FRO produites par les PLB-985 stimulées avec le PMA 200 nM.....</i> | 121 |

| | |
|--|-----|
| <i>Figure 77. Effet du 2-APB à 100 μM sur les FRO produites par les cellules stimulées avec le PMA 200nM.....</i> | 122 |
| <i>Figure 78. Effet du MDEB les FRO générées par les PLB-985</i> | 123 |
| <i>Figure 79. Mesure simultanée de la $[Ca^{2+}]_{cyt}$ et la production de FRO par les cellules PLB-985 différenciées stimulées avec le fMLF..</i> | 124 |
| <i>Figure 80. Mesure simultanée de la $[Ca^{2+}]_{cyt}$ et la production de FRO par les cellules PLB-985 différenciées traitées avec la Tg.</i> | 124 |
| <i>Figure 81. Mesure simultanée de la $[Ca^{2+}]_{cyt}$ et la production de FRO par les cellules PLB-985 différenciées stimulées avec le WKYMVm.</i> | 125 |
| <i>Figure 82. Récapitulatif des mesures simultanées des $[Ca^{2+}]_{cyt}$ et de la production de FRO suite aux diverses stimulations</i> | 125 |
| <i>Figure 83. Le WKYMVm et non pas le fMLF désensibilise les FPR.....</i> | 127 |
| <i>Figure 84. Une trace de courant Isoc enregistrée dans les cellules PLB-985 différenciées....</i> | 128 |
| <i>Figure 85. Structures des analogues du 2-APB, PBA, DMBA et DP3A.....</i> | 132 |
| <i>Figure 86. Effet similaire du Cyclic-APB et DMBA sur le SOCE des cellules T Jurkat</i> | 133 |
| <i>Figure 87. Effet similaire du Thienyl-APB et 2-ABB sur le SOCE des cellules T Jurkat.....</i> | 134 |