



Contrôle β -adrénergique du courant calcique de type L cardiaque

Le chaînon manquant enfin découvert

Jérôme Leroy, Rodolphe Fischmeister

Université Paris-Saclay, Inserm UMR-S 1180, Signalisation et physiopathologie cardiovasculaire, 5 rue Jean-Baptiste Clément, 92296 Châtenay-Malabry, France.

jerome.leroy@universite-paris-saclay.fr

> La contraction du muscle cardiaque (myocarde) résulte d'une onde de dépolarisation, le potentiel d'action, qui prend naissance dans le nœud sinusal et se propage dans le tissu cardiaque. Le courant calcique de type L, encore appelé $I_{Ca,L}$, intervient durant la phase de plateau du potentiel d'action ventriculaire, et reflète l'entrée de calcium dans le cardiomyocyte. Ce courant déclenche la contraction en provoquant l'ouverture du récepteur-canal de la ryanodine et ainsi la vidange de la réserve d'ions Ca^{2+} du réticulum sarcoplasmique¹. Parmi les différents facteurs modulant cette entrée de calcium dans le cardiomyocyte, la stimulation β -adrénergique est la mieux décrite. Lorsque nous sommes soumis à un stress ou un danger, la noradrénaline et l'adrénaline libérées par les fibres du système nerveux sympathique et par les glandes médullosurrénales stimulent la fonction cardiaque par leur effet inotrope positif², qui est en partie lié à l'augmentation d' $I_{Ca,L}$. Si ce contrôle de la fonction cardiaque par les catécholamines, mis en jeu dans la réponse comportementale de type « fuite ou combat » (*fight or flight*), est connu depuis longtemps, le mécanisme de la régulation d' $I_{Ca,L}$ lors de ce processus physiologique restait obscur. Il vient d'être mis à jour dans une étude réalisée par Liu *et al.*, publiée dans la revue *Nature* [1].

L'effet stimulateur des catécholamines sur $I_{Ca,L}$ est dû à l'augmentation de la durée d'ouverture du canal $Ca_v1.2$ véhiculant ce courant calcique et à un déplacement de son activation (et, moindre, de son inactivation) vers des valeurs plus négatives du potentiel de membrane. Cela se traduit par une augmentation de deux à trois fois de l'amplitude du courant. Les catécholamines, en se fixant aux récepteurs β -adrénergiques (β -AR), activent, par l'intermédiaire d'une protéine $G\alpha_s$, les adénylate cyclases qui synthétisent l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc), dont la cible principale est la protéine kinase dépendante de l'AMPc (PKA) (Figure 1). Bien que la possibilité d'une stimulation directe des canaux calciques par les protéines $G\alpha_s$ ait d'abord été envisagée, il a été clairement établi, il y aura bientôt 30 ans, que cette stimulation implique une phosphorylation par la PKA, qui augmente $I_{Ca,L}$ [2]. Depuis lors, l'hypothèse d'une phosphorylation directe du canal $Ca_v1.2$ a été explorée par de nombreux chercheurs qui se sont évertués à déterminer quels motifs de ce canal étaient les cibles de la PKA.

$Ca_v1.2$ est une protéine multimérique, dont la sous-unité principale, α_{1C} , constitue le pore du canal. Cette protéine de 240 kDa est constituée de quatre domaines hydrophobes, formés de six segments transmembranaires chacun, qui confèrent au canal ses propriétés biophysiques et pharmacologiques. La sous-unité principale α_{1C} est associée à des protéines auxiliaires dont

l'une, $\alpha_2\text{-}\delta$, est largement extracellulaire, et une autre, $Ca_v\beta_2$, intracellulaire, se fixe à la boucle intracellulaire située entre les domaines I et II d' α_{1C} (Figure 1). Ces sous-unités auxiliaires sont impliquées dans l'expression du canal $Ca_v1.2$ à la membrane plasmique et influencent ses propriétés biophysiques. En particulier, $Ca_v\beta_2$ augmente la probabilité d'ouverture du canal et influence la dépendance de son activation et de son inactivation vis-à-vis du potentiel électrique de membrane [3]. Les sous-unités α_{1C} et $Ca_v\beta_2$ de $Ca_v1.2$ présentent de nombreux sites potentiels de phosphorylation par PKA (Figure 1). Compte tenu de l'implication de $Ca_v\beta_2$ dans les propriétés biophysiques du canal, le rôle d'une phosphorylation de cette sous-unité auxiliaire sur trois de ses résidus sérine avait été proposé puis démenti, puisque la suppression de ces sites, par *knock-in*, chez la souris ne prévient pas la modulation d' $I_{Ca,L}$ par la PKA [4]. Le résidu Ser₁₉₂₈, situé dans la partie C-terminale d' α_{1C} , est phosphorylé par la PKA lors d'une stimulation β -AR, et a longtemps été considéré comme le résidu indispensable au contrôle β -adrénergique du canal. Néanmoins, comme pour $Ca_v\beta_2$, son importance a été contestée. Le rôle critique de la partie C-terminale d' α_{1C} avait cependant été réaffirmé par l'identification du résidu Ser₁₇₀₀ comme celui qui, lorsqu'il est phosphorylé par la PKA, conduisait à l'augmentation d' $I_{Ca,L}$ [5]; mais là encore, son rôle a ensuite été démenti [6]. Dans leur étude, Liu *et al.* réfutent définitivement l'hypothèse

¹ Le réticulum sarcoplasmique est un réseau complexe de cavités à l'intérieur de la cellule musculaire, constituant un compartiment cellulaire dans lequel le calcium nécessaire à la contraction musculaire est mis en réserve.

² L'effet inotrope positif désigne une augmentation de la puissance de contraction du muscle cardiaque (myocarde).

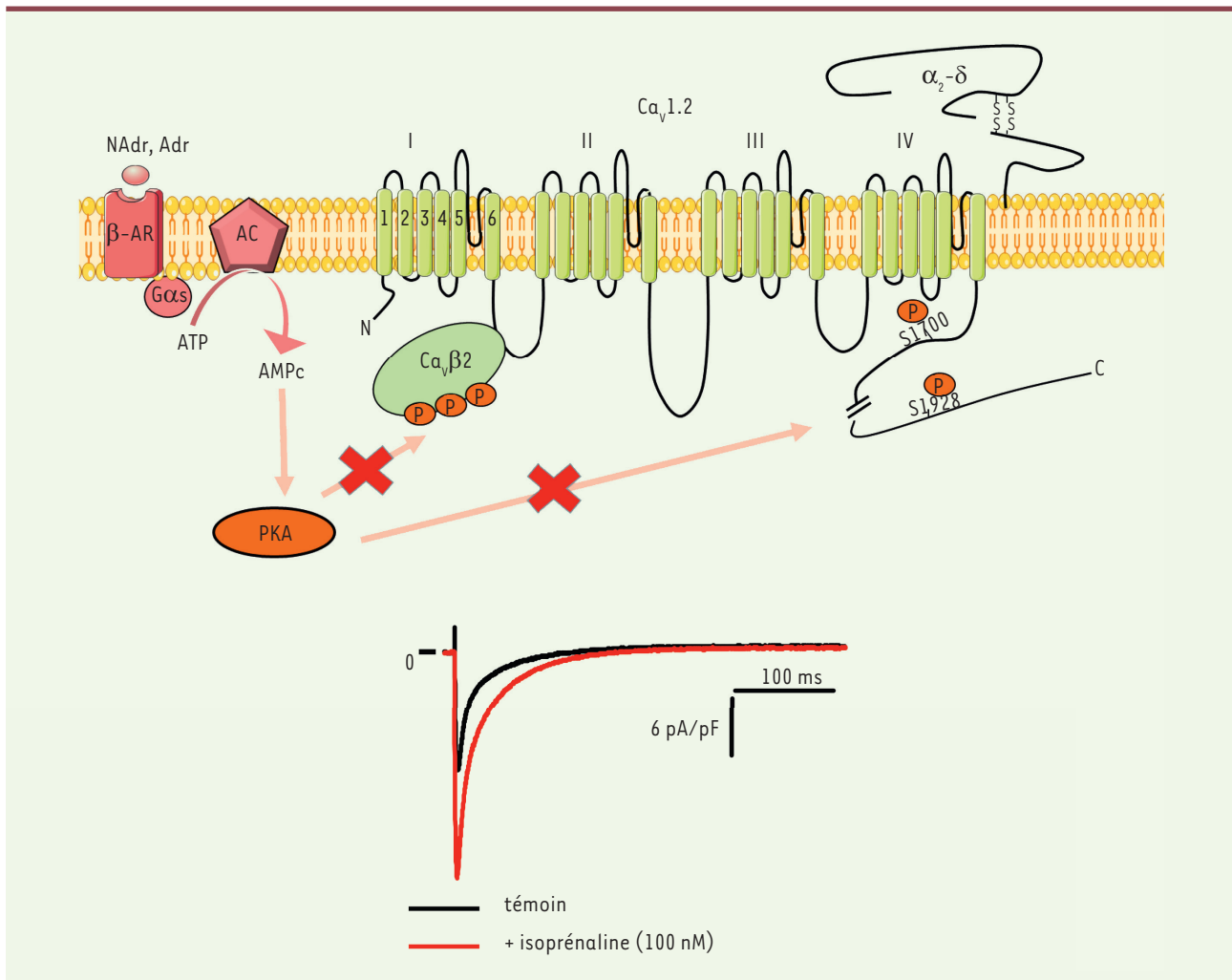


Figure 1. Représentation schématique de la structure du canal calcique cardiaque $Ca_v1.2$ et de ses sous-unités auxiliaires ($Ca_v\beta2$ et $\alpha2-\delta$), et de sa régulation β -adrénergique. Dans le cardiomyocyte, la stimulation des récepteurs β -adrénergiques (β -AR) par la noradrénaline (NAdr) et l'adrénaline (Adr) active, par l'intermédiaire d'une protéine $G\alpha_s$, l'adénylate cyclase qui, à partir d'ATP, synthétise l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc), dont la cible principale est la protéine kinase dépendante de l'AMPc (PKA). Il avait été proposé que cette kinase phosphorylait la partie C-terminale de la sous-unité principale α_{1C} ou la sous-unité $Ca_v\beta2$ du canal calcique $Ca_v1.2$. En mutant tous les sites cibles potentiels de la phosphorylation par PKA, Liu *et al.* démontrent que la phosphorylation directe de $Ca_v1.2$ n'est pas requise pour augmenter l'amplitude du courant I_{CaL} lors de l'activation des β -AR. La partie basse de la figure montre une trace de courant I_{CaL} d'un cardiomyocyte de souris, mesurée grâce à la technique de *patch-clamp*, en l'absence (en noir) ou en présence (en rouge) d'isoprénaline.

de l'implication d'une phosphorylation directe des sous-unités du canal $Ca_v1.2$ dans sa régulation β -adrénergique. En effet, après avoir remplacé, par mutagénèse dirigée, les 88 résidus sérine et thréonine des sous-unités α_{1C} et $Ca_v\beta2$, cibles potentielles de la PKA, par un résidu alanine (non phosphorylable), ils montrent que le canal muté exprimé dans le cœur de souris répond tout à fait normalement à une stimulation β -adrénergique ou à une élévation de la

concentration d'AMPc intracellulaire. Il fallait donc chercher ailleurs, et envisager un partenaire du canal comme cible potentielle de la PKA [1].

Liu *et al.* ont utilisé une approche originale de protéomique pour rechercher le chaînon manquant à cette modulation du canal. Pour trouver ce partenaire, ils ont associé à $Ca_v1.2$ une enzyme permettant la biotinylation de l'ensemble des protéines se trouvant dans un périmètre d'environ 20 nm. Les

protéines ainsi étiquetées ont ensuite été identifiées par spectrométrie de masse. Parmi les centaines de protéines ainsi marquées, l'une d'elles, la protéine Rad (*Ras-associated with diabetes*), est enrichie dans l'environnement du canal en conditions basales, et sa présence est fortement réduite lorsque les échantillons ont été soumis à une stimulation β -adrénergique. Rad est une GTPase connue pour inhiber $Ca_v1.2$ par son interaction avec $Ca_v\beta2$ [7].

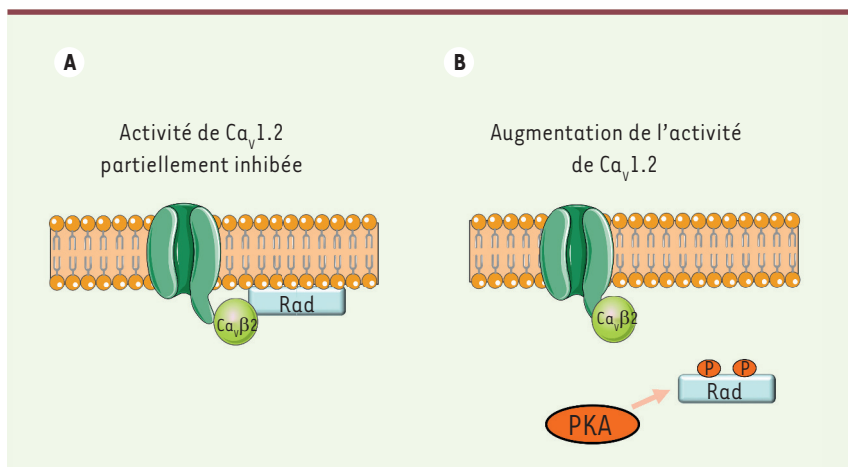


Figure 2. Régulation β -adrénergique de $Ca_v1.2$ impliquant Rad. Dans le modèle que proposent Liu *et al.*, la petite protéine G Rad est la cible de la PKA qui contrôle l'activité de $Ca_v1.2$. En l'absence de stimulation β -adrénergique, Rad est ancrée à la membrane plasmique par sa partie C-terminale, et se fixe à la sous-unité $Ca_v\beta2$ du canal pour inhiber son activité. Lorsque la PKA est activée, elle phosphoryle Rad, ce qui dissocie cette dernière de la membrane plasmique et libère $Ca_v\beta2$, qui peut ainsi augmenter l'activité du canal pour promouvoir l'entrée de calcium dans le cardiomyocyte.

Cette petite protéine G monomérique, très abondante dans le cœur, avait été identifiée comme un inhibiteur endogène d' $I_{Ca,L}$. En effet, la surexpression du gène codant Rad atténue les effets de la stimulation β -adrénergique sur le couplage excitation-contraction dans les cardiomyocytes [8], tandis que son invalidation augmente $I_{Ca,L}$ en lui conférant des caractéristiques similaires à celles du courant stimulé par PKA [9]. De plus, des sites de phosphorylation de Rad par la PKA étaient connus [10]. En résumé, une protéine qui apparaît *a posteriori* comme le candidat parfait ! Les pièces d'un puzzle déjà présentes dans la littérature ont ainsi été assemblées par Liu *et al.*, qui remettent au centre de cette régulation la sous-unité $Ca_v\beta2$ et l'interaction avec le canal d'une petite protéine G. En utilisant la technique de transfert d'énergie entre protéines fluorescentes (*fluorescence resonance energy transfer*, FRET), les auteurs montrent que la phosphorylation de Rad par la PKA inhibe son interaction avec $Ca_v\beta2$, ce que confirme la substitution de quatre résidus sérine de Rad, cibles de la PKA, par des résidus alanine, qui prévient la dissociation des

deux protéines. De plus, ces mutations empêchent la levée d'inhibition de l'activité de $Ca_v1.2$. Les auteurs précisent que deux de ces résidus sérine, situés dans la partie C-terminale de la protéine, sont indispensables non seulement aux effets inhibiteurs de Rad sur $I_{Ca,L}$, mais aussi pour sa dissociation de la membrane, où elle s'associerait avec les phospholipides chargés négativement comme le phosphatidylinositol-4,5-biphosphate (PIP2). Ainsi, d'après ces travaux, en l'absence d'une stimulation β -adrénergique, Rad, ancrée à la membrane plasmique par sa partie C-terminale, séquestrerait la sous-unité $Ca_v\beta2$ du canal $Ca_v1.2$. Les catécholamines, en activant la voie AMPc/PKA, permettraient la phosphorylation de Rad, sa dissociation de la membrane plasmique, et libèreraient $Ca_v\beta2$, qui pourrait ainsi augmenter l'activité du canal pour promouvoir l'entrée de calcium dans le cardiomyocyte et contribuer à l'effet inotrope positif de la stimulation β -adrénergique (Figure 2).

Plus de 50 ans après la découverte de l'augmentation de $I_{Ca,L}$ par l'adrénaline [11, 12], il semble donc que Liu *et al.* ont enfin élucidé le mystère du mécanisme

moléculaire de cet effet en identifiant la petite protéine G Rad comme le chaînon manquant dans la régulation de $Ca_v1.2$ par la PKA. Certes, les travaux de cette équipe de chercheurs, dirigée par S.O. Marx, ont été réalisés en surexprimant $Ca_v1.2$ dans des systèmes hétérologues, ou en introduisant un canal exogène dans le contexte plus physiologique du cardiomyocyte, et ces approches expérimentales sont critiquables. On peut néanmoins raisonnablement espérer que l'analyse de souris « *knock-in* » chez lesquelles les sites de phosphorylation de Rad par la PKA auront été mutés validera le modèle suggéré par les résultats de cette remarquable étude.

Bien qu'elle semble clore un chapitre important de la recherche concernant le mécanisme du contrôle β -adrénergique d' $I_{Ca,L}$, cette étude ouvre également de nouveaux champs d'exploration. On peut par exemple se demander quels rôles jouent le GTP et l'activité GTPase de Rad dans cette régulation d' $I_{Ca,L}$, et plus largement dans la signalisation par β -AR ? La question du rôle de l'interaction entre Rad et $Ca_v\beta2$ dans le trafic et l'expression fonctionnelle de $Ca_v1.2$ à la membrane est posée. Qu'en est-il de cette régulation du fonctionnement des canaux calciques par Rad dans d'autres tissus comme les vaisseaux ? L'interaction de Rad avec $Ca_v1.2$ modifie-t-elle ses propriétés pharmacologiques ? Il y a peu d'études concernant le rôle de Rad en conditions pathologiques, mais il semble que son expression est diminuée dans le cœur des patients insuffisants cardiaques à fraction d'éjection³ réduite [13]. Qu'en est-il dans d'autres maladies cardiaques, comme la fibrillation atriale ? Peut-on espérer, en ciblant Rad ou son interaction avec $Ca_v1.2$, obtenir un effet inotrope positif ou à l'inverse, inhiber une entrée de calcium

³ La fraction d'éjection est le pourcentage d'éjection du sang contenu dans une cavité cardiaque lors de sa contraction. En l'absence de précision, elle désigne généralement la fraction d'éjection du ventricule gauche, qui est un reflet de la bonne fonction contractile de cette partie du cœur la plus importante pour son rôle de pompe.

pro-arythmique ou qui contribue au remodelage cardiaque pathologique ? Peut-on espérer traiter de manière plus spécifique certaines formes d'insuffisance cardiaque en ciblant Rad plutôt qu'en utilisant des médicaments β -bloquants ? \diamond

β -adrenergic regulation of the L-type Ca^{2+} current: the missing link eventually discovered

LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

- Liu G, Papa A, Katchman AN, et al. Mechanism of adrenergic $\text{Ca}_v1.2$ stimulation revealed by proximity proteomics. *Nature* 2020 ; 577 : 695-700.
- Hartzell HC, Méry PF, Fischmeister R, et al. Sympathetic regulation of cardiac calcium current is due exclusively to cAMP-dependent phosphorylation. *Nature* 1991 ; 351 : 573-6.
- Hofmann F, Flockerzi V, Kahl S, et al. L-type $\text{Ca}_v1.2$ calcium channels: from *in vitro* findings to *in vivo* function. *Physiol Rev* 2014 ; 94 : 303-26.
- Brandmayr J, Poomvanicha M, Domes K, et al. Deletion of the C-terminal phosphorylation sites in the cardiac β -subunit does not affect the basic β -adrenergic response of the heart and the $\text{Ca}_v1.2$ channel. *J Biol Chem* 2012 ; 287 : 22584-92.
- Fuller MD, Emrick MA, Sadilek M, et al. Molecular mechanism of calcium channel regulation in the fight-or-flight response. *Sci Signal* 2010 ; 3 : ra70.
- Yang L, Katchman A, Samad T, et al. β -adrenergic regulation of the L-type Ca^{2+} channel does not require phosphorylation of $\alpha1C$ Ser₁₇₀₀. *Circ Res* 2013 ; 113 : 871-80.
- Finlin BS, Crump SM, Satin J, et al. Regulation of voltage-gated calcium channel activity by the Rem and Rad GTPases. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003 ; 100 : 14469-74.
- Wang G, Zhu X, Xie W, et al. Rad as a novel regulator of excitation-contraction coupling and β -adrenergic signaling in heart. *Circ Res* 2010 ; 106 : 317-27.
- Ahern BM, Levitan BM, Veeranki S, et al. Myocardial-restricted ablation of the GTPase RAD results in a pro-adaptive heart response in mice. *J Biol Chem* 2019 ; 294 : 10913-27.
- Moyers JS, Zhu J, Kahn CR. Effects of phosphorylation on function of the Rad GTPase. *Biochem J* 1998 ; 333 : 609-14.
- Reuter H. The dependence of the slow inward current on external calcium concentration in Purkinje fibres. *J Physiol* 1967 ; 192 : 479-92.
- Vassort G, Rougier O, Garnier D, et al. Effects of adrenaline on membrane inward currents during the cardiac action potential. *Pflügers Arch* 1969 ; 309 : 70-81.
- Levitan BM, Manning JR, Withers CN, et al. Rad-deletion phenocopies tonic sympathetic stimulation of the heart. *J Cardiovasc Transl Res* 2016 ; 9 : 432-44.

Bertrand Jordan a participé à l'extraordinaire aventure de la biologie moléculaire, encore balbutiante dans les années 1960, mais qui a complètement révolutionné les sciences du vivant au cours des décennies suivantes.

L'ADN, quasiment inaccessible au début de cette période, intervient maintenant dans d'innombrables recherches, de l'écologie à l'anthropologie, sans oublier bien sûr la médecine dont il fait désormais partie intégrante. Nous pouvons aujourd'hui lire intégralement l'ADN d'une personne en quelques heures, et en tirer de précieuses informations pour la prévention et le traitement de nombreuses maladies – et nous n'en sommes qu'au début de cette nouvelle médecine !



Acteur mais aussi témoin de ces avancées, Bertrand Jordan fait ici un récit très personnel et sans langue de bois de sa vie avec l'ADN. Ce livre ne prétend pas être une histoire complète de la biologie moléculaire, mais il illustre son développement, révélant parfois le « dessous des cartes » grâce aux expériences vécues par son auteur.



BON DE COMMANDE

À retourner à EDP Sciences, 17 avenue Hoggar, 91944 Les Ulis
Tél. : 01 49 85 60 69 - Fax : 01 49 85 03 45 - E-mail : francois.flori@edpsciences.org

NOM : Prénom :

Adresse :

Code postal : Ville :

Pays :

Fonction :

Je souhaite recevoir

Au commencement était le Verbe : 20 € + 3 € de port = 23 € TTC

en exemplaire, soit un total de €

Par chèque, à l'ordre de EDP Sciences

Par carte bancaire : Visa Eurocard/Mastercard

Carte n° | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

Date d'expiration : | | | | | | | | N° de contrôle au dos de la carte : | | | | | | | | Signature :

ISBN : 978-2-7598-1710-8

110 pages

20 €