

## **De nouveaux partenaires dans l'intimité du couple canal calcique de type L-récepteur de la ryanodine dans le muscle cardiaque**

**Stéphane Hatem  
Isabelle Marty  
Michel Villaz  
Danièle Charlemagne**

Comment l'activité électrique contrôle l'ouverture des récepteurs de la ryanodine? Telle est la principale question posée par le couplage excitation-contraction des myocytes cardiaques et squelettiques depuis plus d'une vingtaine d'années. Les travaux menés ces dernières années sur le couplage excitation-contraction ont parfaitement établi l'existence d'un contrôle local de la contraction du muscle cardiaque. Ils ont également montré que ce contrôle local met en jeu de nombreuses protéines associées au complexe canaux calciques-récepteurs de la ryanodine. Ces protéines permettent non seulement les interactions protéine-protéine mais règlent également plus ou moins directement l'activité des récepteurs de la ryanodine. Ces données soulignent l'importance de l'observation, au cours des cardiopathies, de modifications du couplage fonctionnel entre les canaux calciques et les récepteurs de la ryanodine, qui pourraient intervenir précocement dans les altérations du couplage excitation-contraction.

### ADRESSES

S. Hatem: *chargé de recherche à l'Inserm*. Inserm U. 460, Faculté de médecine Xavier-Bichat, 16, rue Henri-Huchard, 75018 Paris, France. I. Marty: *chargée de recherche à l'Inserm*. M. Villaz: *directeur de recherche au CEA*. Inserm CJF 97-09, CIS/DBMS, CEA Grenoble, 17, rue des Martyrs, 38054 Grenoble, France. D. Charlemagne: *directeur de recherche au Cnrs*. Inserm U. 127, Hôpital Lariboisière, 41, boulevard de la Chapelle, 75475 Paris Cedex 10, France.

**D**ans le myocarde comme dans le muscle squelettique c'est la brusque augmentation de  $Ca^{2+}$  intracellulaire survenant lors de la dépolarisation de la cellule qui active la contraction. Dans ces deux types de myocytes, cette augmentation de  $Ca^{2+}$  est due à la vidange du réticulum sarcoplasmique lorsque s'ouvrent les

canaux du relargage du réticulum sarcoplasmique appelés récepteurs de la ryanodine (RyR). Comment l'activité électrique contrôle l'ouverture des RyR est la question-clé posée par le couplage excitation-contraction (CEC) des myocytes cardiaques et squelettiques depuis plus de 20 ans (*figure 1*). La possibilité d'enregistrer simultanément les courants ioniques

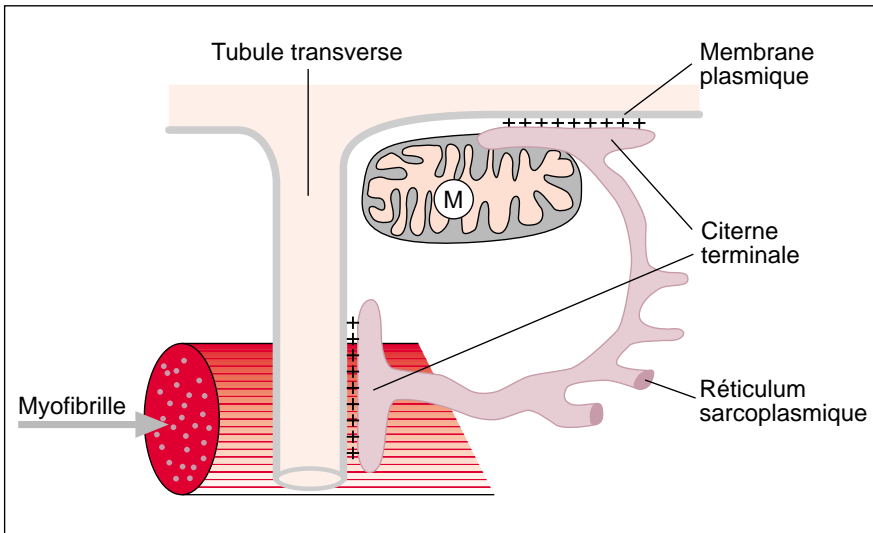


Figure 1. **Schéma d'une diade constituée de l'accolement d'une citerne terminale du réticulum sarcoplasmique à une invagination à l'intérieur de la cellule de la membrane plasmique appelée tubule transverse.** Si une deuxième citerne terminale était accolée au tubule transverse, il s'agirait alors d'une triade. (D'après une illustration originale du Professeur Edouard Corabœuf.)

membranaires et les variations de  $Ca^{2+}$  intracellulaire dans un myocyte isolé a apporté des informations majeures sur la nature de ce couplage. On a pu ainsi établir que l'activation des RyR suit celle du courant calcique de type L (transporté par les canaux calciques de type L) démontrant l'existence d'un couplage entre les deux types de canaux [1] (figure 2). Ce couplage est exclusivement lié aux mouvements transmembranaires d'ions  $Ca^{2+}$ , le changement de potentiel membranaire n'intervenant pas dans le déclenchement de la contraction, contrairement au muscle squelettique [2]. Par ailleurs, d'autres systèmes faisant entrer du  $Ca^{2+}$  dans la cellule, comme l'échangeur Na-Ca, peuvent, dans certaines conditions, également déclencher la vidange du réticulum sarcoplasmique [3] rendant peu probable un couplage moléculaire étroit entre les canaux calciques et les RyR dans les myocytes cardiaques.

**En quoi l'expression d'un canal calcique de type cardiaque ou squelettique va-t-elle diriger la spécificité du couplage?**

Les canaux calciques de type L sont constitués d'une sous-unité  $\alpha 1$  qui

forme le pore du canal et qui est associée à trois autres sous-unités réglant son activité ( $\alpha 2/\delta$  et  $\beta$ ); une cinquième sous-unité  $\gamma$  n'est présente que dans le muscle squelettique [4]. Huit isoformes de  $\alpha 1$  ont été identifiées, codées par des gènes différents. La sous-unité cardiaque  $\alpha_{1c}$  est codée par le gène *CACNA1C* et la sous-unité squelettique  $\alpha_{1s}$  par le gène *CACNA1S*. L'équipe de Shosaku Numa et Kurt Beam (New Haven, CN, USA) a été l'une des pionnières dans la mise en évidence du rôle de la sous-unité  $\alpha 1$  grâce à leurs travaux utilisant des myotubes provenant de souris sauvages et mutantes dysgéniques (*mdg/mdg*) qui n'expriment pas  $\alpha 1s$  et dont la contractilité musculaire est effondrée. Ils ont ainsi observé que la micro-injection d'ADNc codant pour  $\alpha 1s$  dans des myotubes *mdg/mdg* restaure le courant calcique et la contractilité, établissant ainsi le rôle de cette sous-unité dans le couplage excitation-contraction [5]. En 1989, cette équipe a montré que l'injection des ARNm d' $\alpha_{1c}$ , cette fois dans des ovocytes de *Xenopus laevis*, entraîne l'apparition d'un courant calcique de type cardiaque sensible aux dihydropyridines [6]. Cette étude a permis, en 1990, de franchir l'étape suivante qui a consisté à montrer que, lorsque

les myotubes de souris mutantes *mdg/mdg* expriment la sous-unité  $\alpha_{1c}$ , l'activation de la contraction est de type cardiaque (dépendant du  $[Ca^{2+}]_o$ ) et cela bien que le RyR soit de type squelettique alors que l'injection de l'ADNc d' $\alpha 1s$  restaure une activité de type squelettique [7]. L'ensemble de ces travaux a ainsi clairement établi le rôle joué par la sous-unité  $\alpha 1$  dans le type de signalisation entre les canaux calciques de type L et les RyR.

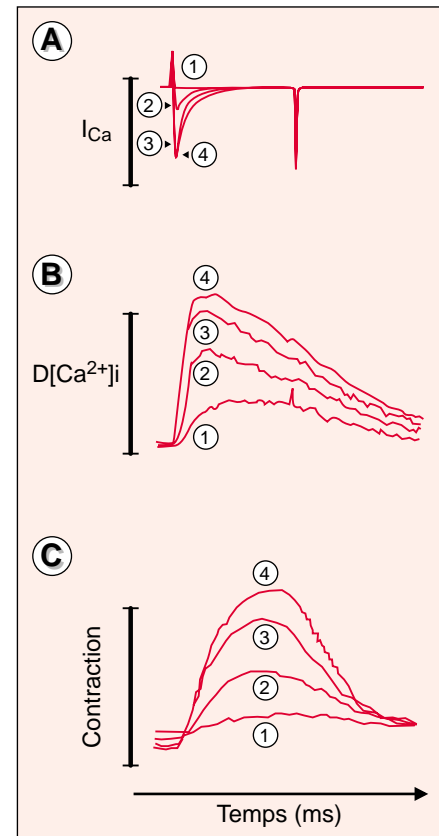


Figure 2. **Mise en évidence d'un couplage entre l'activation des canaux calciques de type L et la libération de  $Ca^{2+}$  par le réticulum sarcoplasmique.** Enregistrement simultané dans un cardiomyocyte isolé du courant calcique de type L (A) de la concentration de  $Ca^{2+}$  libre intracellulaire (B) et de la contraction de la cellule (C). L'augmentation de l'amplitude du courant calcique (tracés 1, 2, 3 et 4) entraîne l'accroissement de l'amplitude du signal calcique, lié à la vidange du réticulum sarcoplasmique, ainsi que du raccourcissement du myocyte. (Adapté d'après [1].)

## **En quoi l'expression d'un RyR de type cardiaque ou squelettique va-t-elle diriger la spécificité du couplage ?**

Le récepteur de la ryanodine est un tétramère formé de quatre sous-unités identiques de 560 kDa environ. Les trois isoformes connues de RyR sont codées par trois gènes provenant d'un gène ancestral commun et présentent donc une homologie importante (66 % d'identité). RyR1 est l'isoforme du muscle squelettique ; RyR2 est l'isoforme du muscle cardiaque et du cerveau ; RyR3 est exprimée de façon ubiquitaire à un faible niveau. Ce canal a été identifié par microscopie électronique dans le muscle squelettique ; il se présente comme une structure de trèfle à quatre feuilles dont les feuilles qui forment la structure également appelée « pied » représente 80 % de la protéine et s'étendent du réticulum sarcoplasmique au sarcolemme alors que la partie canal est transmembranaire [8]. Une structure semblable a été retrouvée dans le muscle cardiaque. RyR1 et RyR2 ont des propriétés très voisines (sensibilité au  $\text{Ca}^{2+}$ , au  $\text{Mg}^{2+}$ , à l'ATP, à la ryanodine...) mais se différencient par leur poids moléculaire (RyR1 > RyR2) et leur conductance pour le calcium (RyR1 > RyR2).

Comme pour les canaux calciques, c'est l'utilisation de souris mutantes qui a permis de démontrer l'implication des isoformes du RyR dans la spécificité du couplage. L'inactivation du gène de RyR1 chez la souris [9] (mutation *skrr*<sup>m1</sup>/*skrr*<sup>m1</sup>) provoque le décès des nouveau-nés par déficience respiratoire. Les caractéristiques anatomiques de ces souris sont proches de celles des souris *mdg/mdg* ou des souris déficientes en myogénine, marquées par des anomalies graves de la contractilité du muscle squelettique. Ainsi l'absence de « protéines pied » chez les mutants se répercute sur la structure de la triade en réduisant l'espace entre les tubules T et les citernes terminales du réticulum sarcoplasmique et en modifiant l'organisation des canaux calciques [10]. De plus, l'intensité du courant calcique est diminuée de 30 fois dans le muscle squelettique de ces souris mutantes, malgré la présence de canaux calciques en densité

équivalente [11]. L'injection de l'ADNc de RyR1 dans les myotubes de ces mutants restaure le couplage excitation-contraction de type squelettique. En revanche, les myotubes exprimant RyR2 ne répondent plus à la dépolarisation mais présentent des oscillations calciques spontanées caractéristiques du phénotype cardiaque [12] mais, contrairement à RyR1, RyR2 est incapable de normaliser l'activité des canaux calciques.

## **Le couplage excitation-contraction des myocytes cardiaques est modulable**

L'autre caractéristique majeure du couplage excitation-contraction des myocytes cardiaques est qu'il est modulable. C'est l'amplitude du courant calcique (reflet du nombre de charges ou d'ions  $\text{Ca}^{2+}$  transportés par les canaux calciques) qui détermine la quantité de  $\text{Ca}^{2+}$  libérée par le réticulum sarcoplasmique et ainsi la force de contraction de la cellule. Le caractère modulé du couplage excitation-contraction est apparu très tôt comme contradictoire avec le fait que le  $\text{Ca}^{2+}$  est le facteur déclenchant de sa propre libération (*Ca<sup>2+</sup> induced Ca<sup>2+</sup> release*) [12]. Un tel processus devrait aboutir à un système fonctionnant sur le mode du tout-ou-rien (autocatalytique) puisque, même de faibles variations de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire devraient activer de proche en proche l'ensemble des RyR. M.D. Stern (Baltimore, MD, USA) [13] a montré que le caractère modulable du couplage excitation-contraction est incompatible avec l'existence d'un espace de diffusion commun au  $\text{Ca}^{2+}$  entrant dans la cellule et à celui relargué par le réticulum sarcoplasmique (théorie du *common pool model*). Pour résoudre ce qu'il est communément appelé le paradoxe du couplage excitation-contraction, Stern a proposé l'existence d'un contrôle local de l'activation des RyR qui pourrait être exercé par les canaux calciques interagissant avec quelques RyR. L'ensemble fonctionnerait comme une « synapse calcique », véritable unité élémentaire, séparée fonctionnellement ou anatomiquement des autres unités. Il existe des arguments architecturaux en faveur d'un contrôle local du couplage électromécanique représentés

par les diades (ou triades dans le muscle squelettique) qui permettent le contact étroit entre les canaux calciques et les RyR. D'ailleurs, dans les myocytes du myocarde auriculaire, caractérisés par le faible développement des tubules T, une grande partie des citernes du réticulum sarcoplasmique n'est pas couplée à la membrane plasmique (réticulum sarcoplasmique corbulaire) et de nombreux RyR n'interagissent pas avec les canaux calciques si bien que la libération de  $\text{Ca}^{2+}$  par le réticulum sarcoplasmique n'est que partiellement contrôlée par les canaux calciques [14].

L'utilisation récente de la microscopie confocale permettant de visualiser des variations du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire dans des micro-espaces cellulaires a apporté des arguments décisifs en faveur de l'existence d'un contrôle local du couplage excitation-contraction. Il a ainsi été observé des variations de  $\text{Ca}^{2+}$  de faible amplitude (quelques dizaines de nM) de quelques  $\mu\text{m}$  de circonférence (entre 0,5 et 3  $\mu\text{m}$ ) qui, en l'absence de surcharge calcique du réticulum sarcoplasmique, n'entraînent pas d'activité calcique propagée. Ces événements calciques localisés, appelés *Ca-sparks* ou étincelles calciques, correspondent vraisemblablement à l'activation d'un ou, plus probablement, de quelques RyR [15]. L'ouverture des canaux calciques, lors de la dépolarisation membranaire, entraîne une augmentation de la probabilité de survenue des étincelles, dont l'amplitude et la durée restent par ailleurs inchangées [16-18]. Si bien que l'idée qui prévaut actuellement est que la variation globale systolique du  $\text{Ca}^{2+}$  est le résultat de la sommation d'événements élémentaires représentés par l'ouverture d'un canal calcique et de l'activation des quelques RyR qui lui sont associés, confirmant ainsi la théorie de Stern sur le contrôle local du couplage excitation-contraction (figure 3). Il semble que ce soit l'ouverture initiale des canaux calciques qui active le groupe de RyR (*cluster*) qui leur sont associés alors que leur réouverture tardive, lors du maintien de la dépolarisation, n'a pas d'effet sur le processus de relargage. Cela s'oppose à l'idée ancienne formulant que c'est le temps d'ouverture des canaux cal-

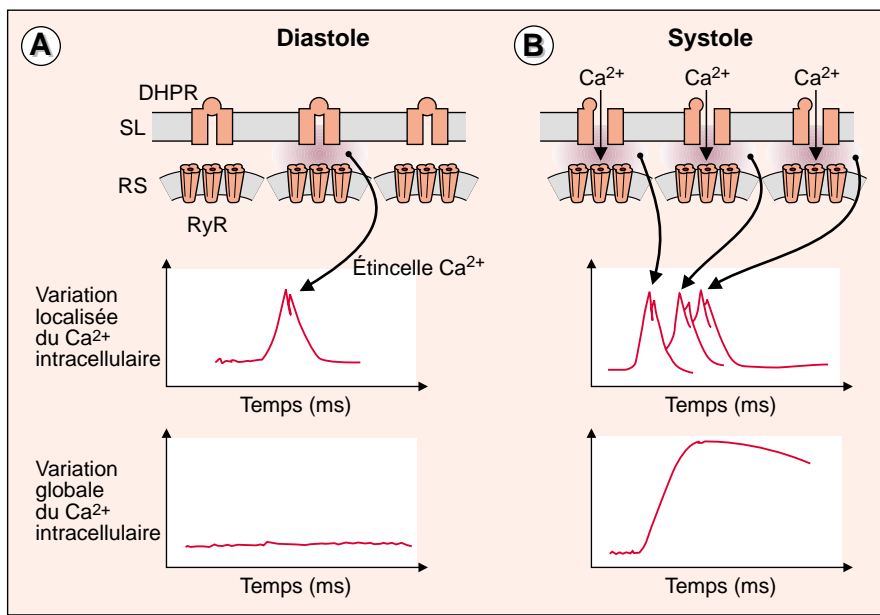


Figure 3. **Schéma illustrant le caractère localisé du couplage excitation-contraction.** Les canaux calciques (DHPR) du sarcolemme (SL) interagissent avec quelques récepteurs de la ryanodine (RyR) organisés en groupes de canaux. En diastole (A), lorsque les canaux calciques sont fermés, seuls quelques groupes de canaux s'activent, c'est-à-dire laissent passer du  $\text{Ca}^{2+}$  du réticulum sarcoplasmique (RS) vers le cytosol qui est responsable d'une variation localisée de  $\text{Ca}^{2+}$  (étincelle calcique) alors que la concentration de cet ion dans l'ensemble du milieu intracellulaire varie peu. En systole (B), l'ouverture des canaux calciques entraîne l'activation de tous les groupes de canaux en contact avec les canaux calciques, qui est responsable d'une augmentation de la fréquence de survenue des étincelles calciques et d'une variation importante et rapide de la concentration du  $\text{Ca}^{2+}$  libre intracellulaire.

ciques qui détermine la durée du relargage calcique [1] et suggère l'existence de mécanismes propres de fermeture des RyR qui s'opposent à la propagation de  $\text{Ca}^{2+}$ -induced  $\text{Ca}^{2+}$  release. De tels mécanismes ont été mis en évidence à l'échelon des canaux unitaires [19]. Ainsi, lorsque les RyR, incorporés dans une bicouche lipidique, sont exposés à une augmentation rapide et prolongée de la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique, ils s'ouvrent rapidement puis se ferment lentement, malgré la persistance d'une concentration élevée de  $\text{Ca}^{2+}$ , mais gardent la capacité de répondre à une nouvelle augmentation brusque de  $\text{Ca}^{2+}$  extraluminal. Cette adaptation des RyR aux variations de  $\text{Ca}^{2+}$  est différente d'une désensibilisation et reflète vraisemblablement une transformation de la molécule responsable d'une diminution de l'affinité pour le  $\text{Ca}^{2+}$  du site d'activation des RyR qui devient disponible pour un nouvel accroissement du  $\text{Ca}^{2+}$ . Ces résultats soulignent la complexité de la régulation

de l'activité des RyR qui, très clairement, ne dépend pas seulement du nombre d'ions  $\text{Ca}^{2+}$  qui traversent les canaux calciques.

### RyR et DHPR ne suffisent pas

Les difficultés expérimentales à isoler le complexe canal calcique-RyR [20], comme l'impossibilité de reproduire un couplage excitation-contraction dans des cellules non musculaires (type CHO) exprimant la sous-unité  $\alpha_{1s}$  et le RyR1 [21], ont amené à rechercher activement la présence de protéines associées qui permettraient l'établissement de contact entre les canaux calciques et les RyR et à la mise en place d'une triade/diade fonctionnelle. Et, en effet, de nombreuses études de biochimie et de biologie moléculaire ont identifié de telles protéines dont il revient maintenant aux physiologistes d'en déterminer la fonction dans le couplage excitation-contraction (figure 4). En attendant les résultats de ces études de physiologie

« inverse », il est difficile d'éviter qu'un article portant sur ces nouveaux partenaires du couple canal calcique-RyR n'en soit que l'inventaire.

La calséquestrine est la plus anciennement connue de ces protéines. Elle piège le calcium à l'intérieur du réticulum sarcoplasmique avec une faible affinité mais une très grande capacité de liaison du calcium (40 à 50 mol/mol). Bien qu'il s'agisse d'une protéine soluble, la calséquestrine est localisée spécifiquement au niveau des citernes terminales du réticulum sarcoplasmique jonctionnel dans lequel elle interagit avec les autres protéines du réticulum sarcoplasmique. Ainsi le RyR et la calséquestrine sont fonctionnellement couplés *via* la triadine [22] et la jonctine [23]. Il vient d'être montré dans les myocytes ventriculaires de souris transgéniques surexprimant la calséquestrine que la quantité de  $\text{Ca}^{2+}$  mobilisable par le réticulum sarcoplasmique est considérablement augmentée mais, en revanche, l'efficacité avec laquelle les canaux calciques de type L déclenchent le relargage calcique du réticulum sarcoplasmique est fortement diminuée démontrant ainsi clairement le rôle majeur joué par la calséquestrine dans la régulation du couplage excitation-contraction [24].

On connaît de mieux en mieux le rôle joué dans le couplage excitation-contraction par des protéines FKBP12 et FKBP12,6 (*FK-506 binding protein*) de 12 et 12,6 kDa. Il s'agit de protéines de la famille des immunophilines, récepteurs des molécules immunosuppressives FK-506 et rapamycine douées d'une activité enzymatique de type proline isomérase. L'association RyR1-FKBP12 (quatre FKBP12 par tétramère du RyR) a été mise en évidence par co-immunoprécipitation et co-purification. Puis il a été montré que la présence de FKBP12 modifiait le fonctionnement du RyR1 en favorisant un état de conductance maximal du canal [25]. En présence de FK506, la FKBP12 devient soluble et se dissocie de RyR1 qui présente alors des états de sous-conductances. Le RyR2 serait non seulement associé à l'isoforme cardiaque FKBP12.6 mais également à la FKBP12 comme le suggère l'étude de Shou *et al.* (Houston, TX, USA) portant sur un modèle d'inactivation du



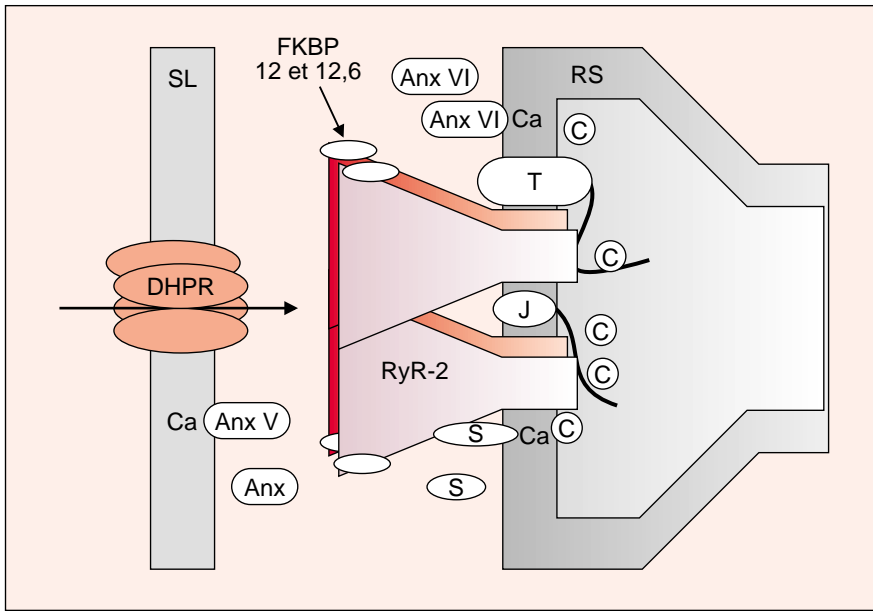


Figure 4. **Localisation schématique des protéines présentes dans une diade cardiaque.** SL: sarcolemme; RS: réticulum sarcoplasmique; DHPR: canal calcique de type L; RyR-2: récepteur de la ryanodine cardiaque; C: calséquestrine; T: triadine; J: jonctine; Anx: annexines; S: sorcine.

gène de FKBP12 chez la souris [26]. De façon surprenante, les souris au gène invalidé présentent d'importantes anomalies cardiaques marquées par une communication intraventriculaire et une dilatation des quatre chambres cardiaques, ce qui explique probablement une mortalité élevée *in utero* et une durée de vie courte. En revanche, elles ne présentent pas de défaut de la contraction des muscles squelettiques alors que l'étude *in vitro* de l'activité de RyR1 et RyR2 montre que l'absence de FKBP12 dans les deux cas favorise les états de sous-conductance de RyR1 et RyR2 et prolonge leur temps d'ouverture. Ces résultats démontrent l'importance de FKBP12 dans la régulation de l'activité des RyR et dans l'organogenèse du muscle cardiaque. En fait, la forte expression de FKBP12 dans le cœur, au cours des étapes embryonnaires, explique probablement le phénotype essentiellement cardiaque observé chez les mutants qui en sont dépourvus. L'absence de malformation des muscles squelettiques suggère une implication tout à fait différente de la protéine FKBP12 dans l'organogenèse des muscles cardiaque et squelettique. La récente étude du groupe

de Marks (New York, USA) [27] pourrait également fournir une explication pour la différence d'atteinte entre les muscles squelettique et cardiaque des souris déficientes en FKBP12. Ces auteurs montrent que le FKBP12 permet le couplage fonctionnel entre différents RyR1 et ainsi la synchronisation de leur activation lors de la dépolarisation cellulaire. Un tel mécanisme pourrait jouer un rôle majeur dans le cas du myocarde dans lequel on sait que, contrairement au muscle squelettique, le canal calcique de type L n'est pas couplé à un seul RyR mais à plusieurs (*cluster*). Dans ce cas, l'absence de FKBP12 pourrait entraîner une désorganisation majeure de la signalisation calcique.

La sorcine est une protéine de liaison du calcium (de 22 kDa), qui a été tout d'abord identifiée dans les cellules MDR (*multidrug resistance*), puis dans des cellules normales, ainsi que dans de nombreux tissus. Dans les myocytes cardiaques, la sorcine serait associée au RyR2 [28]. Cette étude a également montré de façon inattendue que la surexpression de sorcine dans des cellules qui n'expriment pas le RyR entraîne, outre l'accumulation de sorcine, l'apparition de RyR.

Depuis lors, on sait que la sorcine joue probablement un rôle important dans la régulation de l'activité des RyR cardiaques. Ainsi l'enrichissement en sorcine de microsomes contenant des RyR cardiaques entraîne une diminution de l'ouverture de ces derniers et un allongement de leur temps de fermeture. Cet effet inhibiteur de la sorcine est levé lorsque la protéine est phosphorylée par les protéine-kinases de façon assez similaire à l'inhibition de la Ca-ATPase du réticulum sarcoplasmique exercée par le phospholamban, qui est levée lorsque celui-ci est phosphorylé [29]. Il vient également d'être montré que la sorcine interagit avec l'extrémité carboxy-terminale de la sous unité  $\alpha 1$  du canal calcique, c'est-à-dire la partie de la protéine qui intervient dans l'inactivation du canal, un processus qui pourrait ainsi être réglé par la sorcine [30].

Identifiée dans les années 1990 dans le muscle squelettique, la triadine, protéine de 95 kDa, tient son nom de sa localisation dans la membrane des citernes terminales du réticulum accolées à la membrane des tubules T [31]. Des études d'interaction protéine-protéine réalisées sur nitrocellulose ou à l'aide de colonnes d'affinité ont montré que cette protéine pouvait interagir à la fois avec le RyR et avec le DHPR. Cependant, la topographie de la triadine [32] montre qu'une cinquantaine d'acides aminés seulement sont cytoplasmiques (l'extrémité amino-terminale), le reste de la protéine étant luminal. Dans ces conditions, il est difficile d'imaginer comment la triadine pourrait faire le lien dans le cytoplasme entre le canal calcique et le RyR si bien que le seul rôle envisagé pour la triadine jusqu'à présent est celui d'un lien entre la calséquestrine et le RyR. Il reste cependant à interpréter des résultats récents d'un de nos laboratoires: des anticorps dirigés contre l'extrémité amino-terminale de la triadine perturbent l'ouverture du RyR. Trois isoformes cardiaques ont été identifiées: CT1 (32 kDa), CT2 (35 kDa) et CT3 (92 kDa), mais seule CT1 interagit avec d'autres protéines.

La jonctine est une protéine de 26 kDa, également localisée au niveau du réticulum sarcoplasmique jonctionnel [33]. Cette protéine pos-

sède des homologies de séquence dans sa partie amino-terminale avec l'aspartyl  $\beta$ -hydroxylase. Elle possède également quelques homologies avec la triadine comme un court segment amino-terminal cytoplasmique, une seule hélice transmembranaire et la majeure partie de la protéine luminale. La jonctine a été identifiée comme la protéine interagissant de façon majoritaire avec la calséquestrine. Elle se lie à RyR2 de manière dépendante du calcium. Identifiée d'abord dans le muscle cardiaque, la même protéine est également présente dans le muscle squelettique. Elle pourrait être connectée à la calséquestrine *via* la triadine (isoforme CT1 dans le cœur [23]).

Les annexines forment une famille ubiquitaire de protéines cytosoliques qui possèdent la propriété de se lier aux phospholipides membranaires en présence de calcium. Elles sont ainsi impliquées dans différents processus cellulaires faisant intervenir le calcium comme le trafic membranaire, l'exocytose ou l'endocytose. Les principales annexines cardiaques sont l'annexine II, l'annexine V et l'annexine VI. Au cours de l'insuffisance cardiaque, chez l'homme et chez l'animal, les annexines s'accumulent dans les espaces intermyocytaires. De même, la surexpression de l'annexine VI chez des souris transgéniques entraîne la survenue d'une cardiopathie dilatée [34]. Cependant, leur rôle dans le couplage excitation-contraction du myocarde est encore largement inconnu. On sait seulement que l'annexine VI module *in vitro* l'activité de RyR1 et de l'échangeur Na/Ca.

Enfin, très peu de choses sont connues sur la protéine S100A1 (21 kDa) dans le contexte du couplage excitation-contraction. Cette protéine de liaison du  $Ca^{2+}$ , exprimée de façon spécifique de tissu ou de cellule, intervient dans de nombreuses fonctions cellulaires souvent en partenariat avec la calmoduline. La protéine S100A1 est majoritairement exprimée dans les cellules musculaires striées où elle se lie à RyR1 par trois sites d'interaction [35]. Dans le cœur, l'expression de la S100A1 est réduite chez les patients en insuffisance cardiaque terminale [36], mais il n'existe à ce jour aucune

donnée sur l'association de la S100A1 avec le RyR2.

## Conclusions

Les travaux menés ces dernières années sur le couplage excitation-contraction ont parfaitement établi l'existence d'un contrôle local de la contraction du muscle cardiaque. Ils ont également montré que ce contrôle local, nécessaire au caractère modulé du  $Ca^{2+}$ -induced  $Ca^{2+}$  release, met en jeu de nombreuses protéines associées au complexe canaux calciques-RyR. Ces protéines permettent non seulement les interactions protéine-protéine mais règlent également plus ou moins directement l'activité des RyR comme cela est le cas pour la FKBP12.6 et la sorcine. Ces données soulignent tout l'intérêt et l'importance de l'observation, au cours des cardiopathies, de modifications du couplage fonctionnel entre les canaux calciques et les RyR, modifications qui pourraient intervenir précocement dans les altérations du couplage excitation-contraction [37, 38]. Il est certain que les profonds changements de l'architecture des myocytes hypertrophiés, et en particulier ceux touchant les diades, contribuent à la perte du couplage normal entre les canaux calciques et les RyR. Mais il y a fort à parier que l'étude de l'expression et de l'activité des protéines associées au couple canaux calciques-RyR apportera un éclairage nouveau sur les altérations du couplage excitation-contraction au cours des cardiopathies ■

## RÉFÉRENCES

1. Cleemann L, Morad L. Role of the  $Ca^{2+}$  channel in cardiac excitation-contraction coupling in rat: evidence from  $Ca^{2+}$  transients and contraction. *J Physiol (Lond)* 1991; 432: 283-312.
2. Nabaüer M, Callewaert G, Cleemann L, Morad M. Regulation of calcium release is gated by calcium current, not gating charge in cardiac myocytes. *Science* 1989; 244: 800-3.
3. Leblanc N, Hume J. Sodium current-induced release of calcium from cardiac sarcoplasmic reticulum. *Science* 1990; 248: 372-6.
4. Nargeot J, Charnet P. Diversité moléculaire des canaux calciques: du gène à la fonction. *Med Sci* 1994; 10: 1293-308.

5. Tanabe T, Beam KG, Powell JA, Numa S. Restoration of excitation-contraction coupling and slow calcium currents in dysgenic mice by dihydropyridine receptor complementary DNA. *Nature* 1988; 336: 134-9.

6. Mikami A, Imoto K, Tanabe T, Niidome T, Mori Y, Takeshima H, Narumiya S, Numa S. Primary structure and functional expression of the cardiac dihydropyridine-sensitive calcium channel. *Nature* 1989; 340: 230-3.

7. Tanabe T, Mikami A, Numa S, Beam KG. Cardiac-type excitation-contraction coupling in dysgenic skeletal muscle injected with cardiac dihydropyridine receptor cDNA. *Nature* 1990; 344: 451-3.

8. Takeshima H, Ino M, Takekura H, Nishi M, Kuno J, Minowa O, Takano H, Noda T. Excitation-contraction uncoupling and muscular degeneration in mice lacking functional skeletal muscle ryanodine-receptor gene. *Nature* 1994; 369: 556-9.

9. Takekura H, Nishi M, Noda T, Takeshima H, Franzini-Armstrong C. Abnormal junctions between surface membrane and sarcoplasmic reticulum in skeletal muscle with a mutation targeted to the ryanodine receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 3381-5.

10. Nakai J, Dirksen RT, Nguyen HT, Pessah IN, Beam KG, Allen PD. Enhanced dihydropyridine receptor channel activity in the presence of ryanodine receptor. *Nature* 1996; 380: 72-5.

11. Yamazawa T, Takeshima H, Sakurai T, Endo M, Iono M. Subtype specificity of the ryanodine receptor for  $Ca^{2+}$  signal amplification in excitation-contraction coupling. *EMBO J* 1996; 15: 6172-7.

12. Fabiato A. Time and calcium dependence of activation and inactivation of calcium-induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of a skinned canine Purkinje cell. *J Gen Physiol* 1985; 85: 247-89.

13. Stern MD. Theory of excitation-contraction coupling in cardiac muscle. *Biophys J* 1992; 63: 497-517.

14. Hatem SN, Bénardeau A, Rücker-Martin C, Marty I, De Chamisso P, Villaz M, Mercadier JJ. Different compartments of sarcoplasmic reticulum participate in the excitation-contraction coupling process in human atrial myocytes. *Circ Res* 1997; 80: 345-53.

15. Cheng H, Lederer WJ, Cannell MB. Calcium sparks: elementary events underlying excitation-contraction coupling in heart muscle. *Science* 1993; 262: 740-4.

16. Cannell MB, Cheng H, Lederer WJ. The control of calcium release in heart muscle. *Science* 1995; 268: 1045-50.

17. López-López JR, Shacklock PS, Balke CW, Wier WG. Local calcium transients triggered by single L-type calcium channel currents in cardiac cells. *Science* 1995; 268: 1042-5.

18. Santana LF, Cheng H, Gómez AM, Cannell MB, Lederer WJ. Relation between the sarcolemmal  $Ca^{2+}$  current and  $Ca^{2+}$  sparks and local control theories for cardiac excitation-contraction coupling. *Circ Res* 1996; 78: 166-71.

## RÉFÉRENCES

19. Györke S, Fill M. Ryanodine receptor adaptation control mechanism of  $Ca^{2+}$ -induced  $Ca^{2+}$  release in heart. *Science* 1993; 260: 807-9.
20. Marty I, Robert M, Villaz M, Lai Y, De Jongh KS, Catterall WA, Ronjat M. Biochemical Evidence for a complex involving Dihydropyridine Receptor and Ryanodine Receptor in Triad Junctions of Skeletal Muscle. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 2270-4.
21. Suda N, Franzius D, Fleig A, Nishimura S, Bödding M, Hoth M, Takeshima H, and Penner R.  $Ca^{2+}$ -induced  $Ca^{2+}$  release in Chinese Hamster Ovary (CHO) cells co-expressing dihydropyridine and ryanodine receptors. *J Gen Physiol* 1997; 109: 619-31.
22. Guo W, Campbell KV. Association of triadin with the ryanodine receptor and calsequestrin in the lumen of the sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 1995; 270: 9027-30.
23. Zhang L, Kelley G, Schmeisser G, Kobayashi YM, Jones LR. Complex formation between junctin, triadin, calsequestrin and the ryanodine receptor. *J Biol Chem* 1997; 272: 23389-97.
24. Jones LR, Suzuki YJ, Kobayashi YM, Ramesh V, Franzini-Amstrong C, Cleemann L, Morad M. Regulation of  $Ca^{2+}$  signaling in transgenic mouse cardiac myocytes overexpressing calsequestrin. *J Clin Invest* 1998; 101: 1385-93.
25. Brillantes AM, Ondrias K, Scott A, Kobrinski E, Ondriasova E, Moschella MC, Jarayaman T, Landers M, Ehrlich B, Marks AR. Stabilization of calcium release channel (ryanodine receptor) function by FK506-binding protein. *Cell* 1994; 77: 513-23.
26. Shou W, Aghdasi B, Armstrong DL, Guo Q, Bao S, Charng M-J, Mathews LM, Schneider MD, Hamilton SL, Matzuk MM. Cardiac defects and altered ryanodine receptor function in mice lacking FKBP12. *Nature* 1998; 391: 489-92.
27. Marx SO, Ondrias K, Marks AR. Coupled gating between individual skeletal muscle  $Ca^{2+}$  release channels (ryanodine receptors). *Science* 1998; 281: 818-21.
28. Meyers MB, Pickel VM, Sheu SS, Sharma VK, Scotto KW, Fishman GI. Association of sorcin with the cardiac ryanodine receptor. *J Biol Chem* 1995; 270: 26411-8.
29. Lokuta AJ, Meyers M, Sanders PR, Fishman G, Valdivia HH. Modulation of cardiac ryanodine receptor by sorcin. *J Biol Chem* 1997; 272: 25333-8.
30. Meyers MB, Puri TS, Chien AJ, Gao T, Hsu PH, Hosey MM, Fishman G. Sorcin associates with the pore-forming subunit of voltage-dependent L-type  $Ca^{2+}$  channels. *J Biol Chem* 1998; 273: 18930-5.
31. Caswell AH, Brandt NR, Brunschwig JP, Purkerson S. Localization and partial characterization of the oligomeric disulfide-linked molecular weight 95 000 protein (triadin) which binds the ryanodine and dihydropyridine receptors in skeletal muscle triadic vesicles. *Biochemistry* 1991; 30: 7507-13.
32. Marty I, Robert M, Ronjat M, Bally I, Arlaud G, Villaz M. Localization of the N-terminal and C-terminal ends of triadin with respect to the sarcoplasmic reticulum membrane of rabbit skeletal muscle. *Biochem J* 1995; 307: 769-74.
33. Jones LR, Zhang L, Sanborn K, Jorgensen AO, Kelley J. Purification, primary structure, and immunological characterization of the 26-kDa calsequestrin binding protein (junctin) from cardiac junctional sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 1995; 270: 30787-96.
34. Gunteski-Hamblin AM, Song G, Walsh RA, Frenzke C, Boivin GP, Dorn GW, Kaetzel MA, Horseman ND, Dedman JR. Annexin VI overexpression targeted to heart alters cardiomyocyte function in transgenic mice. *Am J Physiol* 1996; 270: H1091-100.
35. Treves S, Scutari E, Robert M, Groh S, Ottolia M, Prestipino G, Ronjat M, Zorzato F. Interaction of S100A1 with the  $Ca^{2+}$  release channel (ryanodine receptor) of skeletal muscle. *Biochemistry* 1997; 36:11496-503.
36. Remppis A, Greten T, Schafer BW, Hunziker P, Erne P, Katus HA, Heizmann CW. Altered expression of the  $Ca^{2+}$ -binding protein S100A1 in human cardiomyopathy. *Biochim Biophys Acta* 1996; 1313: 253-7.
37. Gomez AM, Valdivia HH, Cheng H, Lederer MR, Santana LF, Cannell MB, McCume SA, Altschud RA, Lederer WJ. Defective excitation-contraction coupling in experimental cardiac hypertrophy and heart failure. *Science* 1997; 276: 800-6.
38. Mercadier J, Hatem S. Recaptage ou relargage ? ou les caprices de la signalisation calcique du myocyte dans l'hypertrophie et l'insuffisance cardiaques. *Med Sci* 1997; 13: 1454-8.

## Summary

### New partners for the L-type $Ca^{2+}$ channel and ryanodine receptor complex

The central question of the excitation-contraction coupling process over the past two decades has been how the L-type  $Ca^{2+}$  channel controls the gating of the ryanodine receptor in cardiac and skeletal muscle. In cardiac myocytes, the general scheme that has emerged provides a primary role for transmembrane influx of  $Ca^{2+}$  through the L-type  $Ca^{2+}$  channels in the gating of ryanodine receptors. However, the difficulty to reproduce the excitation-contraction coupling process in non-muscle cells expressing both L-type  $Ca^{2+}$  channels and ryanodine receptor has strongly suggested that the gating of intracellular  $Ca^{2+}$  stores release required actors other than the two  $Ca^{2+}$  channels. Indeed, a number of biochemical and molecular studies have identified likely candidates for such a partnership with the L-type  $Ca^{2+}$  channel-ryanodine receptor complex. Although only limited information is yet available on the exact function of these proteins in the excitation-contraction coupling process, it already seems clear that they play a major role not only in the physiology of cardiac and skeletal muscle but also in their pathophysiology.

## TIRÉS À PART

S. Hatem.

SOCIÉTÉ DE BIOLOGIE