

## Vers une meilleure compréhension du rôle de la protéine C dans la contraction cardiaque

Les protéines contractiles – actine et myosine – sont organisées respectivement en filaments fins et filaments épais au sein du sarcomère des muscles striés. A ces deux constituants majeurs du sarcomère sont associées différentes protéines structurales et/ou régulatrices. Parmi celles-ci, la protéine C ou MyBP-C (pour *myosin binding protein-C*) avait été décrite en 1973 par Offer [1] comme étant une protéine contaminante lors de la purification des molécules de myosine. On découvrit très vite qu'elle était, en fait, un constituant des filaments épais localisé au niveau de la zone C de la bande A du sarcomère (*figure 1*). La protéine C appartient à la superfamille des immunoglobulines intracellulaires [2] ; elle est formée de sept domaines de type IgI et de trois domaines de type fibronectine-III (C1-C10). Trois isoformes, spécifiques respectivement du muscle squelettique rapide, du muscle squelettique lent et du muscle cardiaque, ont été identifiées [3]. L'ADNc de l'isoforme cardiaque humaine a été récemment cloné ; sa longueur est de 4,4 kb. La protéine correspondante de 1 273 acides aminés possède des séquences spécifiques du muscle cardiaque : l'une comporte neuf acides aminés dans un module situé entre les domaines C1 et C2, où se trouvent des sites qui pourraient être phosphorylés par la protéine kinase A, et une autre de vingt-huit résidus dans le domaine C5 [4]. La fonction de la protéine C est mal connue, et la plupart des études ont porté sur l'isoforme squelettique rapide. Elle partici-

perait à l'assemblage des filaments épais du sarcomère par ses différentes interactions avec la myosine, l'actine et la titine. *In vitro*, elle modifie la périodicité et la longueur des filaments obtenus par auto-assemblage de molécules de myosine et elle module l'activité ATPasique de la myosine qui dépend de l'actine [1, 5]. L'extraction de la protéine C de fibres musculaires pelées augmente la vitesse maximale de raccourcissement et la tension active et altère la relation tension/concentration intracytoplasmique du  $Ca^{2+}$  [6, 7]. A partir de ces données, il a été proposé que MyBP-C réduirait la probabilité de liaison de la myosine à l'actine et serait l'un des constituants d'une « charge interne » qui ralentirait la vitesse maximale de raccourcissement de la fibre musculaire. L'isoforme cardiaque jouerait, en outre, un

rôle modulateur de la contraction cardiaque. Dans le cœur isolé de rat, stimulé par des agonistes adrénergiques en présence de phosphate radioactif, l'augmentation de la tension systolique est associée à l'incorporation de 3 moles de phosphate par mole de protéine C [8]. Cette incorporation correspond à la phosphorylation des sites situés dans les régions spécifiques du muscle cardiaque, comme viennent de le montrer Gautel *et al.* [4].

Une fois de plus, la pathologie et la recherche génétique sont venues à l'aide des physiologistes. Le gène codant pour l'isoforme cardiaque humaine a été récemment localisé sur la bande p11 du chromosome 11 [4], faisant de ce gène un excellent candidat pour le *locus CMH4* impliqué dans les cardiomyopathies hypertrophiques (pour revue, voir

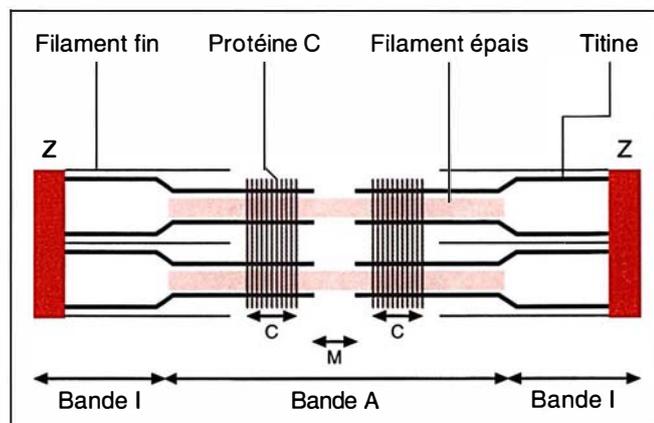


Figure 1. Schéma de l'organisation du sarcomère.

l'article de synthèse [9]). La démonstration vient d'en être apportée par notre équipe [10]. L'ADNc de la protéine C cardiaque a été amplifié par RT-PCR à partir d'ARN lymphocytaire des individus atteints de cardiomyopathie hypertrophique, puis analysé par SSCP (*single strand conformation polymorphism*) [11] et séquençage. Une délétion de 140 pb dans l'ADNc a été trouvée chez des individus atteints, suggérant l'existence d'une mutation dans un site d'épissage. On a déterminé la séquence génomique de la région, notamment celle des jonctions introns-exons, ce qui a permis l'analyse par SSCP de la région correspondante de l'ADN génomique. Un profil de migration différent a été trouvé chez les individus atteints et on a identifié par séquençage une mutation ponctuelle dans un site accepteur d'épissage, CAG → CGG. Cette mutation entraîne le saut de l'exon correspondant (140 pb), un décalage du cadre de lecture et l'apparition d'un codon stop prématuré (figure 2). Elle crée également un site de coupure par l'enzyme de restriction *Nla IV*, ce qui a permis le criblage rapide de l'ADN génomique d'un grand nombre d'individus. La mutation a été trouvée chez tous les individus atteints, non seulement dans la famille étudiée, mais aussi dans une autre famille dans laquelle une liaison avec le locus *CMH4* avait été trouvée par haplotypage. En revanche, elle n'a pas été trouvée lors de l'analyse de deux cents chromosomes de sujets sains non apparentés. Ces résultats indiquent donc que la protéine C cardiaque est le gène morbide du locus *CMH4*. C'est la première description d'une maladie génétique cardiaque associée à des mutations dans un gène codant pour une protéine qui se lie à la myosine (*myosin binding protein*).

La structure des trois isoformes de MyBP-C étant très conservée [3], il a semblé licite de transposer à l'isoforme cardiaque les connaissances obtenues à partir d'études faites sur l'isoforme squelettique : les sites d'interaction avec la titine et la myosine se situeraient du côté C-terminal de la protéine cardiaque. Com-

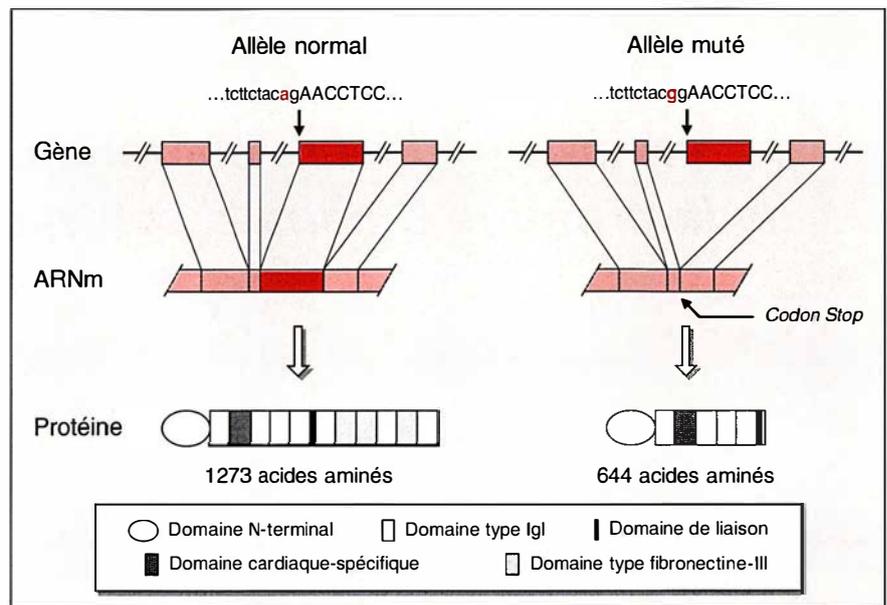


Figure 2. **Identification chez un individu atteint de cardiomyopathie hypertrophique d'une mutation dans un site accepteur d'épissage du gène codant pour la protéine C cardiaque humaine.** La mutation dans le site accepteur d'épissage et l'exon correspondant sont présentés en rouge. Le saut d'exon qui en résulte est responsable de la synthèse d'une protéine tronquée, non seulement de la structure codée par cet exon, mais aussi de toute sa partie carboxyterminale du fait de l'apparition d'un codon stop. Il faut noter ainsi la disparition des domaines type fibronectine-III.

me la mutation se trouve dans la région reliant les domaines C4 et C5, il en résulterait une interruption prématurée de la traduction, aboutissant à une protéine tronquée de ses six cents derniers acides aminés carboxyterminaux (50 % de la protéine) (figure 2), avec, pour conséquence probable, une perte des sites d'interaction avec les autres constituants du sarcomère. La délétion emporte également les vingt-huit résidus spécifiques du cœur, donc peut-être des régions d'interactions avec des protéines de régulation. Enfin, bien que les sites de phosphorylation ne soient pas délétes, on peut envisager que la protéine tronquée se présente sous une conformation anormale qui modifierait l'accessibilité de ces sites à la protéine kinase A, altérant la réponse du cœur à une stimulation adrénergique [4]. On a donc de

multiples raisons de penser que des mutations du gène codant pour MyBP-C conduisent à une altération de la structure et/ou de la fonction du sarcomère cardiaque; elles peuvent entraîner une hypertrophie compensatrice, comme c'est le cas pour les autres gènes morbides déjà identifiés dans la cardiomyopathie hypertrophique. La génétique moléculaire a donc éclairé d'un jour nouveau le rôle joué par la protéine C dans le cœur de mammifères. Peu d'équipes ont jusqu'à présent travaillé sur cette protéine, et l'on peut penser que la découverte de son implication dans une maladie cardiaque va stimuler des travaux dans ce domaine.

G.B.  
L.C.  
K.S.

# **Les mutants déficients en rapsyne révèlent un rôle essentiel inattendu de cette protéine**

1. Offer G, Moos C, Starr R. A new protein of the thick filaments of vertebrate skeletal myofibrils: extraction, purification and characterization. *J Mol Biol* 1973 ; 74 : 653-76.
2. Einheber S, Fischman DA. Isolation and characterization of a cDNA clone encoding avian skeletal muscle C-protein: an intracellular member of the immunoglobulin superfamily. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990 ; 87 : 2157-61.
3. Yamamoto K, Moos C. The C-proteins of rabbit red, white, and cardiac muscles. *J Biol Chem* 1983 ; 258 : 8395-401.
4. Gautel M, Zuffardi O, Freiburg A, Labeit S. Phosphorylation switches specific for the cardiac isoform of myosin binding protein C: a modulator of cardiac contraction? *EMBO J* 1995 ; 14 : 1952-60.
5. Moos C, Feng INM. Effect of C-Protein on actomyosin ATPase. *Biochim Biophys Acta* 1980 ; 632 : 141-9.
6. Hofmann PA, Hartzell HC, Moss RL. Alterations in Ca<sup>2+</sup> sensitive tension due to partial extraction of C-protein from rat skinned cardiac myocytes and rabbit skeletal muscle fibers. *J Gen Physiol* 1991 ; 97 : 1141-63.
7. Hofmann PA, Greaser ML, Moos RL. C-protein limits shortening velocity of rabbit skeletal muscle fibres at low levels of Ca<sup>2+</sup> activation. *J Physiol* 1991 ; 439 : 701-15.
8. Schlender KK, Bean LJ. Phosphorylation of chicken cardiac C-protein by calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. *J Biol Chem* 1991 ; 266 : 2811-7.
9. Carrier L, Guicheney P, Schwartz K. La cardiomyopathie hypertrophique familiale : maladie du sarcomère cardiaque ? *médecine/sciences* 1995 ; 11 : 1685-93.
10. Bonne G, Carrier L, Bercovici J, Cruaud C, Richard P, Hainque B, Gautel M, Labeit S, James M, Weissenbach J, Vosberg HP, Fiszman M, Komajda M, Schwartz K. A splice acceptor site mutation in the cardiac myosin binding protein-C gene is associated with familial hypertrophic cardiomyopathy. *Nature Genet* 1996 ; 11 (sous presse).
11. Dreyfus JC, Akli S, Poenaru L. Maladies de Tay-Sachs et de Sandhoff. Les déficits en  $\beta$ -hexosaminidases, modèles des maladies des lysosomes. *médecine/sciences* 1992 ; 8 : 797-803.

La jonction neuromusculaire, qui ne couvre que 1/10 000 de la totalité de la surface musculaire, est un paradigme de spécialisation membranaire. Tous les composants moléculaires nécessaires à la transmission synaptique, en particulier le récepteur nicotinique de l'acétylcholine (AChR), sont concentrés au niveau de ce site. Le puzzle des différents acteurs impliqués dans ce rassemblement spécifique, comme l' $\alpha$ -dystroglycane, membre du complexe de protéines associées à la dystrophine (DGC) et elle-même récepteur de l'agrine (*m/s n° 10, vol. 10, p. 1042*), se met en place progressivement sans que l'on puisse désigner celui d'entre eux qui joue le rôle fondateur. Il semble que la rapsyne (*receptor-associated protein at the synapse*), une protéine de 43 kDa, soit désormais le candidat favori. Des expériences de reconstitution moléculaire par transfection de différents vecteurs d'expression dans des modèles de culture cellulaire avaient déjà suggéré ce rôle. On peut, par exemple, mentionner le récent travail d'Apel *et al.* [1] qui

montre que la rapsyne, synthétisée sous le contrôle d'un vecteur d'expression transfecté dans des cellules fibroblastiques de caille dépourvues de tout l'arsenal protéique synaptique, est à elle seule capable de se distribuer en agrégats. Si un vecteur d'expression de la dystroglycane ou de l'AChR est ajouté à celui de la rapsyne, la dystroglycane et l'AChR synthétisés se regroupent également dans ces mêmes agrégats alors que, si l'on ne transfecte pas le gène codant pour la rapsyne, ces deux protéines adoptent une répartition homogène. En outre, dystroglycane et AChR ne se regroupent pas isolément (*Tableau I*). La rapsyne semble donc essentielle pour l'agrégation des récepteurs de l'acétylcholine et peut être le relais de l'interaction entre les AChR et le complexe DGC. De plus, l'interaction entre la rapsyne et la dystroglycane semble indépendante des AChR. Une collaboration entre les laboratoires de Merlie et Sanes (USA) a permis d'obtenir, quant au rôle précis *in vivo* de la rapsyne, des informations supplémentaires essentielles

Tableau I	
Vecteurs d'expression transfectés	Organisation en agrégats
Rapsyne	+
Dystroglycane	-
AChR	-
Rapsyne + dystroglycane	+
Rapsyne + AChR	+
Dystroglycane + AChR	-