

## Régulation de la contraction du muscle lisse

Abdellatif Fattoum

Il est établi depuis longtemps que la phosphorylation spécifique, dépendante du complexe  $\text{Ca}^{2+}$ -calmoduline, des chaînes légères régulatrices (LC20) de la myosine par la kinase correspondante (MLCK) représente un événement initiateur capital dans le développement de la force contractile du muscle lisse. Actuellement, on démontre que le filament fin naturel possède également la propriété de moduler la vitesse de raccourcissement de la fibre musculaire en agissant sur le complexe acto-myosine par l'intermédiaire de protéines de découverte récente, fortement liées à l'actine, telles que la caldesmone et la calponine. L'intervention alternée des deux systèmes de régulation, l'un au niveau des filaments épais et l'autre au niveau des filaments fins, pourrait expliquer certaines propriétés du *latch-bridge*, phénomène caractéristique du maintien d'un état contracté en phase tonique, propre au muscle lisse, et, plus particulièrement, au tissu vasculaire, observé lors de la baisse du niveau de phosphorylation de la myosine.

**L**a contraction musculaire est une propriété physiologique fondamentale de la matière vivante et la transduction de l'énergie par le système universel de l'acto-myosine ATPase est une des questions les plus attractives de la biologie moderne. L'intérêt pour la contractilité musculaire et cellulaire a connu à la fin de notre siècle un essor considérable. Après les années 1950-1960 où le développement de la recherche sur le muscle strié squelettique s'est fortement consolidé, on assistait tout au long des années 1970-1980, grâce à l'apport grandissant d'une technologie de plus en plus fine, à un avancement rapide des travaux sur le muscle lisse. L'utilisation conjointe de la microscopie électronique et de

la diffraction des rayons X dans l'analyse des structures subcellulaires, ainsi que l'étude biochimique et physico-chimique de plusieurs macromolécules biologiques récemment purifiées à partir de ce muscle, ont donné une nouvelle dimension à l'appréhension de ses propriétés mécaniques et de leur fonction.

De l'amibe à l'homme, la manifestation de tout mouvement nécessite la conversion de l'énergie chimique en énergie mécanique qui met en œuvre l'interaction de deux protéines majeures, l'actine et la myosine et l'hydrolyse rapide par cette dernière d'une liaison phosphate contenue dans la molécule d'adénosine 5'-triphosphate (ATP) fortement énergétique. Au cours de la contraction musculaire, il y a formation de ponts

### ADRESSE

A. Fattoum : directeur de recherche à l'Inserm. Centre de recherches de biochimie macromoléculaire, Cnrs-UPR 9008, Inserm U. 249, université de Montpellier I, route de Mende, BP 5051, 34033 Montpellier Cedex, France.

### TIRÉS À PART

A. Fattoum.

## RÉFÉRENCES

1. Small JV, Fürst DO, Thornell LE. The cytoskeletal lattice of muscle cells. *Eur J Biochem* 1992; 208: 559-72.
2. North AJ, Gimona M, Cross RA, Small JV. Calponin is localized in both the contractile apparatus and the cytoskeleton of smooth muscle cells. *J Cell Sci* 1994; 107: 437-44.
3. Mabuchi K, Li Y, Tao T, Wang CLA. Immunocytochemical localization of caldesmon and calponin in chicken gizzard smooth muscle. *J Muscle Res Cell Motil* 1996; 17: 243-60.
4. Eldin P, Cornillon B, Mornet D, Léger J. Une nouvelle jeunesse pour les myosines. *Med Sci* 1995; 11: 1005-16.
5. Yanagisawa M, Hamada Y, Katsuragawa Y, Imamura M, Mikawa T, Masaki T. Complete primary structure of vertebrate smooth muscle myosin heavy chain deduced from its complementary DNA sequence. Implications on topography and function of myosin. *J Mol Biol* 1987; 198: 143-57.
6. Babji P, Kelly C, Periasamy M. Characterization of a mammalian smooth muscle myosin heavy chain gene: complete nucleotide and protein coding sequence. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 10676-80.
7. Messer NG, Kendrick-Jones J. Molecular cloning and sequencing of the chicken smooth muscle myosin regulatory light chain. *FEBS Lett* 1988; 234: 49-52.
8. Tan JL, Ravid S, Spudich JA. Control of nonmuscle myosins by phosphorylation. *Annu Rev Biochem* 1992; 61: 721-59.
9. Allen BG, Walsh MP. The biochemical basis of the regulation of smooth-muscle contraction. *Trends Biochem Sci* 1994; 19: 362-8.
10. Herman IM. Actin isoforms. *Curr Op Cell Biol* 1993; 5: 48-55.
11. Smillie LB. Tropomyosin. In: Barany M. ed. *Biochemistry of smooth muscle contraction*. New York: Academic Press, 1996: 63-75.
12. Marston SB, Redwood CS. The molecular anatomy of caldesmon. *Biochem J* 1991; 279: 1-16.
13. Bartegi A, Fattoum A, Kassab R. Cross-linking of smooth muscle caldesmon to the NH<sub>2</sub>-terminal region of skeletal F-actin. *J Biol Chem* 1990; 265: 2231-7.

transversaux intermoléculaires entre les têtes globulaires de la myosine et les monomères polymérisés de l'actine avec le glissement des filaments fins sur les filaments épais. Le cycle d'attachement-détachement des têtes de myosine le long du filament d'actine obéit à des exigences conformationnelles locales transitoires de ces deux protéines, modulables par une multitude de stimulus (métabolites locaux, effecteurs chimiques ou hormonaux) en rapport avec un cortège de protéines spécifiques dites associées à l'actine (tropomyosine,  $\alpha$ -actinine, filamine, gelsoline, profiline, caldesmone et calponine).

La complexité histologique et l'homogénéité relative du tissu musculaire lisse (vasculaire, gastro-intestinal, respiratoire, uro-génital), la purification et la caractérisation encore inachevées de protéines qui seraient impliquées dans la machinerie contractile font que le mécanisme (ou les mécanismes) de régulation et de contrôle de ce muscle n'est pas encore bien établi, comparé à celui, beaucoup mieux connu, du muscle strié (squelettique et cardiaque). Dans cette revue, nous nous proposons de regrouper et d'analyser les données actuelles sur ce sujet.

### Ultrastructure du muscle lisse et organisation des protéines contractiles

Les vaisseaux sanguins, la trachée, les bronches, le larynx, l'estomac, l'intestin, les sphincters, la vessie, l'utérus contiennent une proportion plus ou moins importante de muscle lisse. Ce sont souvent des organes creux vasculaires ou viscéraux ayant l'aptitude de se contracter afin de s'accommoder de leur contenu et de le propulser de plus en plus loin. Ils sont sous le contrôle du système neurovégétatif et jouent un rôle primordial dans divers processus physiologiques vitaux : pression artérielle, péristaltisme, parturition, miction... L'expulsion du nouveau-né au cours de l'accouchement, le râle sibilant de l'asthmatique et le spasme des artères coronaires ne sont autres que des manifestations de la contractilité des cellules musculaires lisses qui constituent la paroi de l'utérus, des voies respiratoires et des vaisseaux sanguins. Relativement peu différen-

ciées, ces cellules sont mononucléées, généralement fusiformes et orientées parallèlement les unes par rapport aux autres avec des extrémités pointues et parfois bifides. De tailles très variables, elles sont 30 fois plus longues dans la paroi utérine (500  $\mu$ m) que dans les capillaires sanguins, mais toujours nettement plus courtes que celles du muscle strié qui peuvent atteindre plusieurs centimètres de long. Elles sont associées entre elles par une charpente de tissu conjonctif renfermant essentiellement du collagène et de l'élastine. La grande plasticité du tissu musculaire lisse rend plus difficile l'étude de son organisation spatiale et de son dynamisme, notamment au niveau de ses différentes structures contractiles qui demeurent pour la plupart d'entre elles aujourd'hui encore peu explorées. C'est dans les années 1970, qu'ont été clairement identifiées à l'intérieur du tissu musculaire lisse des vertébrés trois structures filamenteuses morphologiquement et fonctionnellement différentes : les microfilaments, les filaments intermédiaires et les microtubules avec un diamètre caractéristique correspondant à 8, 10, et 25 nm respectivement. L'organisation irrégulière (absence d'arrangement périodique) de ces fibres diffère de celle ordonnée et cristalline que l'on rencontre dans la cellule du muscle strié. Les filaments de muscle lisse sont regroupés autour de corps denses (aux électrons) dispersés à l'intérieur de la cellule et renfermant notamment de l' $\alpha$ -actinine. Ces corps sont comparables aux stries Z du sarcomère de muscle squelettique et constituent des structures dynamiques responsables de la physiologie périphérique de la cellule et de sa motilité. Certains de ces corps sont associés au cytoplasme, d'autres sont fixés sur des plaques denses, sorte de jonctions de type plaques adhérentes, situées à la face interne de la membrane plasmique et qui servent de points d'attache aux extrémités à croissance rapide des filaments d'actine [1]. Les plaques denses alternent au niveau du sarcolemme avec des régions riches en invaginations ou *caveolae*, véritables réserves de calcium et sites exclusifs de localisation de la dystrophine qui s'exprime d'une manière particulièrement discontinue. Des études immu-

nocytchimiques ont montré que la cellule du muscle lisse contient deux classes principales de filaments fins réparties en deux domaines cytoplasmiques structurellement distincts: un domaine (ou appareil) contractile qui renferme actine, myosine et caldesmone, et un domaine cytosquelettique, dépourvu de myosine et de caldesmone mais contenant actine, filaments intermédiaires (desmine) et filamine. La calponine, une autre protéine majeure du filament fin, a été localisée en partie au niveau de l'appareil contractile, mais aussi et surtout, dans différentes régions du cytosquelette, corps denses et plaques adhérentes, structures proches de la membrane cellulaire [2, 3]. Comprendre aujourd'hui le mécanisme moléculaire de contrôle de la vasomotricité, par exemple, revêt un intérêt primordial dans le cadre des recherches sur les maladies cardiovasculaires, principales causes de morbidité et de mortalité dans les pays industrialisés.

### Propriétés du filament épais

#### • Myosine

Les filaments épais sont constitués principalement de myosine. Dans le muscle lisse la myosine (56  $\mu\text{M}$ ) possède à peu près les mêmes propriétés physico-chimiques que son équivalent du muscle squelettique (0,18 mM): coefficient de sédimentation, poids moléculaire et configuration en tête de flèche caractéristique du complexe *rigor* formé en présence de F-actine. Au point de vue biochimique, la molécule de myosine est un complexe hétérohexamérique non covalent constitué de deux chaînes lourdes de 220 kDa environ chacune, associées au niveau de leurs têtes globulaires à deux paires de chaînes légères: la LC20 de poids moléculaire 20 kDa, phosphorylable, dite chaîne régulatrice, et la LC17 de poids moléculaire 17 kDa, dite chaîne essentielle (figure 1).

La chaîne lourde de la tête globulaire ou S1, de poids moléculaire 95 kDa, est constituée de trois segments 25, 50 et 20 kDa connectés par deux séquences courtes sensibles aux protéases et formant des boucles flexibles à la surface de la protéine. Elle renferme les deux sites nécessaires à sa fonction motrice: celui de l'hydrolyse de l'ATP proche de la jonction amino-

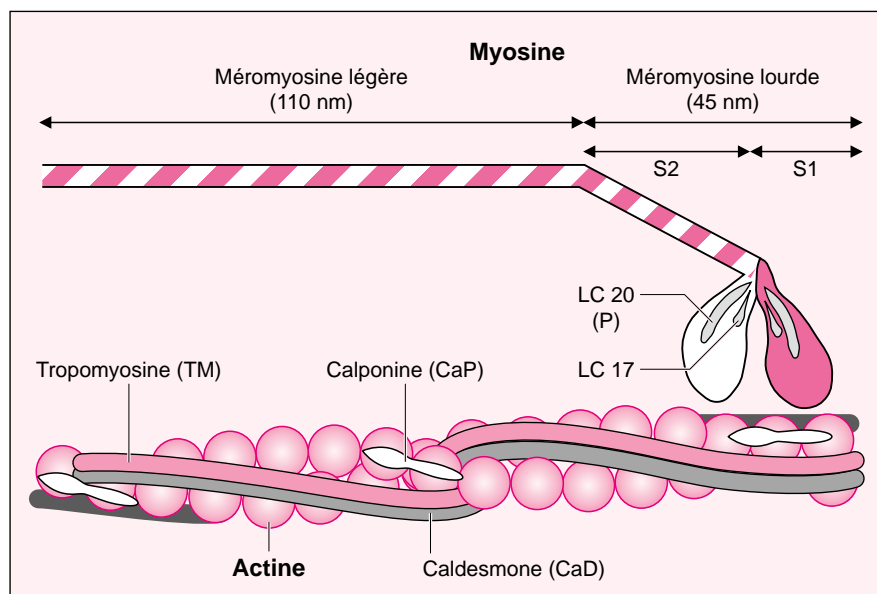


Figure 1. **Représentation schématique du filament fin: filament d'actine et protéines régulatrices associées en présence d'une molécule de myosine du filament épais.**

terminale 25-50 kDa et celui de l'interaction avec l'actine non loin de la jonction 50-20 kDa [4]. Les deux types de chaînes légères sont localisés du côté carboxy-terminal du S1, très proches l'une de l'autre. L'autorégulation de la tête globulaire nécessite l'intégrité structurale de la jonction entre le S1 et la queue fibrillaire (S1/S2). De plus, la corrélation entre la molécule de myosine, sa fonction enzymatique et la stabilité des filaments qu'elle forme à travers les divers tissus musculaires lisses, phasique (viscéral, par exemple) ou tonique (vasculaire, par exemple) devient plus complexe par la présence de plusieurs isoformes présentant des variations structurales situées dans des régions différentes, tant sur la chaîne lourde que sur la chaîne légère. A la différence de ce que l'on observe dans le muscle squelettique où les isoformes de chaînes lourdes sont codées par une famille multigénique, la diversité des chaînes du muscle lisse est principalement engendrée par épissage alternatif. Il a été rapporté que l'insertion de sept acides aminés au niveau de la jonction 25-50 kDa de la tête de myosine de l'intestin réduit l'affinité de l'ADP et accélère sa libération du *cross-bridge*. On connaît depuis peu la séquence nucléotidique complète de la chaîne lourde de myosine de gésier de poulet, de l'utérus

de lapin [5, 6] et de la chaîne légère régulatrice du gésier de poulet [7]. Dans le muscle lisse, les filaments de myosine sont plus longs que ceux du muscle strié (2,2  $\mu\text{m}$  au lieu de 1,5  $\mu\text{m}$ ), avec une forme atypique et une structure labile. L'ultracentrifugation analytique a montré que les molécules de myosine du muscle lisse peuvent se présenter sous deux formes monomériques en équilibre, remarquablement interconvertibles et qui séparent à des vitesses différentes. A pH et force ionique physiologiques et en présence d'ATP-Mg, il y a prédominance de la conformation compacte 10S repliée au 2/3 sur elle-même avec une queue en épingle à cheveux et incapable d'induire la formation des filaments et donc d'interagir avec l'actine. La phosphorylation des chaînes légères régulatrices provoque l'extension de la queue de la molécule et la myosine passe de la forme 10S enzymatiquement inerte (*turnover* de l'ATP-Mg: 0,2-0,5 ms) à une forme 6S active, plus allongée, capable de polymériser en filaments stables même en présence de fortes concentrations de nucléotide. Les deux formes 10S et 6S semblent correspondre respectivement à l'état de relaxation et de contraction musculaire. Cette transition conformationnelle se localise essentiellement à la jonction S1/S2 de la molécule. Elle

## RÉFÉRENCES

14. Mezgueldi M, Derancourt J, Calas B, Kassab R, Fattoum A. Precise identification of the regulatory F-actin-and calmodulin-binding sequences in the 10 kDa carboxyl-terminal domain of caldesmon. *J Biol Chem* 1994; 269: 12824-32.
15. Mak AS, Carpenter M, Smillie LB, Wang JH. Phosphorylation of caldesmon by p34cdc2 kinase. Identification of phosphorylation sites. *J Biol Chem* 1991; 266: 19971-5.
16. Takahashi K, Nadal-Ginard B. Molecular cloning and sequence analysis of smooth muscle calponin. *J Biol Chem* 1991; 266: 13284-8.
17. Represa A, Tabela-Terzidis H, Plantier M, Fattoum A, Jorquera I, Agassandian C, Ben-Ari Y, Der Terrossian E. Distribution of caldesmon and of the acidic isoform of calponin in cultured cerebellar neurons and in different regions of the rat brain: an immunofluorescence and confocal microscopy study. *Exp Cell Res* 1995; 221: 333-43.
18. Maguchi M, Nishida W, Kohara K, Kawano A, Kondo I, Hiwada K. Molecular cloning and gene mapping of human basic and acidic calponins. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 217: 238-44.
19. Mezgueldi M, Mendre C, Calas B, Kassab R, Fattoum A. Characterization of the regulatory domain of gizzard calponin: Interaction of the 145-163 region with F-actin, calcium-binding-proteins and tropomyosin. *J Biol Chem* 1995; 270: 8867-76.
20. El-Mezgueldi M, Strasser P, Fattoum A, Gimona M. Expressing functional domains of mouse calponin: Involvement of the region around alanine 145 in the actomyosin ATPase inhibitory activity of calponin. *Biochemistry* 1996; 35: 3654-61.
21. Frid MG, Schekhonin BV, Koteliansky VE, Glukhova MA. Phenotypic changes of human smooth muscle cells during development: late expression of heavy caldesmon and calponin. *Dev Biol* 1992; 153: 185-93.
- est induite par une phosphorylation coopérative, mais non ordonnée des deux chaînes légères régulatrices et exerce une grande influence sur les propriétés enzymatiques et biologiques de la myosine, ainsi que sur sa susceptibilité protéolytique. Seule la forme phosphorylée peut être activée par l'actine et la déphosphorylation par une phosphatase spécifique conduit à la disparition des structures filamenteuses et à l'inactivation du système actomyosine-ATPase. La phosphorylation qui agit directement sur l'étape cinétique limitante de l'hydrolyse de l'ATP ( $\text{ADP.Pi} \rightarrow \text{ADP} + \text{Pi}$ ) induit l'enchaînement réactionnel qui aboutit au travail mécanique du glissement filamentaire. A l'état phosphorylé, la myosine peut, dans des essais de motilité *in vitro*, déplacer l'actine à une vitesse d'environ  $1 \mu\text{m/s}$  à  $30^\circ$ . La phosphorylation de la myosine du muscle lisse et des cellules non musculaires [8, 9] joue donc un rôle capital dans la régulation dépendante du  $\text{Ca}^{2+}$  de l'activité contractile dont le mécanisme, connu depuis longtemps et généralement bien accepté, sera discuté plus loin.

### Propriétés du filament fin

#### • Actine

Support mécanique de la contraction, l'actine est une protéine ubiquitaire découverte il y a plus de 50 ans et présente dans toutes les cellules eucaryotes animales et végétales. Partie intégrante du cytosquelette sous-membranaire, l'actine est un composant majeur du filament fin qui représente 30 % à 50 % des protéines myofibrillaires totales, selon leur source. La molécule d'actine est formée d'une seule chaîne polypeptidique de 41 872 Daltons, soit 375 acides aminés. Elle est extrêmement conservée au cours de l'évolution et ses propriétés fondamentales (polymérisation, activation de la myosine...) sont d'une constance remarquable quelle que soit son origine. La plupart des eucaryotes supérieurs possèdent diverses isoformes d'actine codées par de multiples gènes [10]. L'actine du muscle lisse se distingue par la prédominance de sa forme  $\gamma$  dans les cellules parenchymateuses (intestin, bronches, appareil génital) et de sa forme  $\alpha$  dans le muscle vasculaire (aorte). Les différents types de muscles lisses peuvent

aussi contenir les formes  $\beta$  et  $\gamma$  de nature cytoplasmique. Au cours du développement des cellules du muscle lisse, on assiste à la diminution graduelle de l'expression de l'isoforme  $\beta$  parallèlement à l'augmentation de celle de l' $\alpha$  ou de la  $\gamma$ -actine. On ne connaît pas encore la fonction exacte de ces diverses isoformes qui se distinguent, entre autres, par leur point isoélectrique et leur spécificité d'expression selon le tissu concerné. Elles pourraient correspondre à certaines compartimentalisations de l'actine dans ses interactions avec les protéines associées. Outre l'actine, protéine majoritaire (0,9-1,6 mM au lieu de 0,7 mM *in situ* pour le muscle squelettique), le filament fin du muscle lisse est constitué de tropomyosine, de caldesmone et de calponine en quantité relativement importante (figure 1). Il est en revanche totalement dépourvu du complexe ternaire, troponines I, T et C, constituant essentiel du filament fin du sarcomère qui règle d'une façon dépendante du  $\text{Ca}^{2+}$  le couplage contraction-relaxation dans les muscles squelettique et cardiaque. Cette particularité représente une différence majeure entre muscle strié et muscle lisse. Du fait de l'absence de ce complexe, la régulation calcique au niveau du filament épais a été longtemps la seule voie régulatrice envisagée.

#### • Tropomyosine

La tropomyosine (TM) du muscle lisse (0,15-0,27 mM) constitue, comme dans le muscle strié (0,1 mM), l'un des principaux composants du filament fin avec une stœchiométrie estimée *in vivo* à une molécule de tropomyosine pour 7 monomères d'actine. Fine et allongée ( $42 \times 2 \text{ nm}$ ) la protéine de masse moléculaire 76 kDa est formée de deux chaînes polypeptidiques  $\alpha$ -hélicoïdales non phosphorylées  $\beta$  et  $\gamma$  (désignées parfois  $\beta$  et  $\alpha$ ) associées en double hélice dans un rapport 1:1 et ayant 284 résidus chacune; l'isoforme  $\beta$  présente une plus grande mobilité en gel dénaturant (sodium dodécyl sulfate). A l'état natif, les chaînes sont assemblées presque exclusivement en hétérodimère  $\beta\gamma$ . On connaît la séquence complète en acides aminés de chacune des deux sous-unités [11]. Comme son homologue squelettique, la tropomyosine lisse est capable, en présence de fortes concentrations de



cations divalents, de former *in vitro* des paracristsaux avec des périodicités très caractéristiques visibles au microscope électronique. En outre, elle peut dans un système enzymatique hybride d'actomyosine remplacer la tropomyosine squelettique et se fixer avec la même affinité que celle-ci à la troponine-T. L'étude structurale paracrystalline a révélé que les molécules de tropomyosine possèdent une polarité et qu'à faible force ionique le dimère polymérise par recouvrement d'une dizaine d'acides aminés appartenant à chacune de ses deux extrémités amino- et carboxy-terminales. Le dimère est disposé le long d'un sillon central étroit flanqué des deux brins torsadés du filament d'actine. A l'état polymérisant, les molécules de tropomyosine du muscle lisse augmentent fortement la viscosité du milieu et ont tendance à s'agréger. Des études biophysiques ont montré que ces mêmes molécules sont plus rigides et moins stables que leurs homologues du muscle strié. Enfin, si l'on connaît, à la faible résolution de 9 Å, la structure des cristaux de la tropomyosine du muscle strié formés en présence de spermine, on ignore presque tout de celle du muscle lisse. L'association « tête à queue » des sous-unités successives est considérée comme l'une des propriétés fondamentales du système de régulation de la contraction musculaire. Avec une constante apparente de dissociation de  $1 \text{ à } 4 \times 10^{-6} \text{ M}$ , l'association tropomyosine-actine est coopérative, ce qui conférerait aux filaments fins leur rigidité et leur stabilité. Si, dans le muscle strié, la tropomyosine joue, en association avec le complexe troponine, un rôle primordial dans la régulation de la contraction, sa fonction dans le muscle lisse dépourvu de troponines est sujette à controverse. Elle pourrait intervenir au niveau de l'activité Mg-ATPase de la myosine dont elle potentialise l'expression, contribuer à la protection et au renforcement de la stabilité du filament fin ou encore à la modulation de la réponse au flux calcique transmembranaire de certaines protéines spécifiques particulièrement abondantes dans le muscle lisse.

#### • Caldesmone

La caldesmone (CaD) a été décrite il y a une quinzaine d'années comme une protéine liant l'actine et la calmodu-

line. Elle est constituée d'une seule chaîne polypeptidique très sensible aux protéases mais ayant la propriété de résister à la dénaturation par la chaleur (5 min à 95 °C) et les acides et d'inhiber l'activité de l'actomyosine-ATPase. Isolée pour la première fois à partir du gésier de poulet, la caldesmone a été ensuite identifiée dans tous les types de tissus musculaires lisses de vertébrés et d'invertébrés et dans un grand nombre de cellules non musculaires. L'isoforme non musculaire (L $\alpha$  et L $\beta$ ) possède une délétion (exclusion de l'exon 3b) de 232 acides aminés (résidus 171-480 de la séquence de caldesmone de gésier de poulet) correspondant au domaine-2 central de son homologue musculaire (h $\alpha$  et h $\beta$ ) et la masse moléculaire calculée d'après l'analyse des séquences d'ADN complémentaire est, respectivement, de 60 kDa et 87 kDa. Les deux isoformes musculaire et non musculaire proviennent de l'épissage alternatif de l'ARNm transcrit à partir d'un seul gène d'environ 14 exons pour la caldesmone humaine. Le changement dans l'expression isotypique et la conversion d'une forme en une autre s'effectuent au cours de la différenciation cellulaire du muscle et de sa modulation phénotypique. Relativement abondante dans le muscle lisse (10-12  $\mu\text{M}$ ), la caldesmone est un composant multifonctionnel intrinsèque du filament fin. Elle est phosphorylable, se lie à la Ca<sup>2+</sup>-calmoduline, à la tropomyosine et à la myosine et peut dissocier le complexe de la profilactine (complexe stable de profiline et d'actine G) et induire la polymérisation de l'actine G (actine globulaire) en absence de tout autre agent polymérisant. Les études biophysiques ont montré que la caldesmone est une molécule asymétrique (74 x 1,9 nm) et flexible constituée de 4 grands domaines structuraux distincts. Cette structure fine et très allongée renferme en son milieu une région  $\alpha$ -hélicoïdale rigide constituée d'une dizaine de motifs répétitifs d'acides aminés très chargés permettant à la molécule de s'étendre parallèlement à la tropomyosine, le long du sillon de la double hélice du filament fin en couvrant 10 à 14 protomères d'actine (figure 1). L'électromicrographie du complexe naturel caldesmone-tropomyosine-F-actine ne laisse apparaître aucune pro-

jection latérale et des modèles d'arrangement de la caldesmone le long du filament fin d'actine ont été proposés. L'hydrolyse ménagée de la caldesmone conduit à la formation de plusieurs fragments peptidiques notamment le fragment de 25 kDa (Phe 581-Pro 756 dans la séquence de la caldesmone de poulet) qui constitue l'extrémité carboxy-terminale de la molécule ou domaine-4. Ce segment de la molécule est bien conservé dans toutes les isoformes et renferme les sites de fixation de la calmoduline, de l'actine, de l'inhibition de l'actomyosine-ATPase et ceux de la phosphorylation [12-15] (figure 2A). La proximité de la Cys-580 de la caldesmone et de la Cys-374, le pénultième résidu de la partie carboxy-terminale de l'actine, a été aussi rapportée. Par sa région NH<sub>2</sub>-terminale ou domaine-1 (résidus 1-170), la caldesmone se fixe au segment S2 de la myosine.

#### • Calponine

La calponine (CaP) est une protéine monomérique de 34 kDa localisée au niveau du filament fin et isolée pour la première fois en 1986 à partir du gésier de poulet et de l'aorte de bœuf. Elle doit son nom à sa capacité d'interagir avec la calmoduline et à sa réactivité immunologique croisée avec la troponine T du muscle squelettique. Exprimée essentiellement dans le muscle lisse où elle est présente à une concentration molaire relativement élevée (100-150  $\mu\text{M}$ ) par rapport à celle de la caldesmone (10  $\mu\text{M}$ ) et de la calmoduline (30  $\mu\text{M}$ ) mais proche de celle de la tropomyosine, la calponine se trouve en quantité beaucoup plus faible dans la plupart des cellules non musculaires où elle est représentée par une isoforme appelée calponine acide. Comme la caldesmone, la calponine est stable à haute température avec, en revanche, la capacité particulière de se renaturer après dénaturation par l'urée. Elle est impliquée activement dans la régulation dépendante du Ca<sup>2+</sup> de la contraction du muscle lisse par son pouvoir inhibiteur de l'activité ATPase de l'actomyosine sans affecter l'état de phosphorylation de la myosine. La séquence nucléotidique complète des deux isoformes  $\alpha$  (292 acides aminés, masse moléculaire = 32,3 kDa) et  $\beta$  (252 acides aminés, masse moléculaire = 28,1 kDa) de

## RÉFÉRENCES

22. Hai CM, Murphy RA.  $\text{Ca}^{2+}$ , cross-bridge phosphorylation, and contraction. *Annu Rev Physiol* 1989; 51: 285-98.

23. Hemric ME, Freedman MV, Chalowich JM. Inhibition of actine stimulation of skeletal muscle (A1)S-1 ATPase activity by caldesmon. *Arch Biochem Biophys* 1993; 306: 39-43.

24. Marston SB, Fraser IDC, Huber PAJ. Smooth muscle caldesmon controls the strong binding interaction between actin-tropomyosin and myosin. *J Biol Chem* 1994; 269: 32104-9.

25. Mani RS, Kay CM. Calcium binding proteins. In: Barany M, ed. *Biochemistry of smooth muscle contraction*. New York: Academic Press, 1996: 105-16.

26. Adam LP, Hathaway DR. Identification of mitogen-activated protein kinase phosphorylation sequences in mammalian h-caldesmon. *FEBS Lett* 1993; 322: 56-60.

27. Katayama E, Scott-Woo G, Ikebe M. Effect of caldesmon on the assembly of smooth muscle myosin. *J Biol Chem* 1995; 270: 3919-25.

28. Yin HL, Albrecht JF, Fattoum A. Identification of gelsolin, a  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent regulatory protein of actin gel-sol transformation, and its intracellular distribution in a variety of cells and tissues. *J Cell Biol* 1991; 91: 901-6.

29. Lamb Ned JC, Fernandez A, Mezgueldi M, Labbé JP, Kassab R, Fattoum A. Disruption of the actin cytoskeleton in living non-muscle cells by microinjection of antibodies to domain-3 of caldesmon. *Eur J Cell Biol* 1996; 69: 36-44.

30. Warren KS, Lin JLC, Wanboldt DD, Lin JJC. Overexpression of human fibroblast CaD fragment containing actin-binding,  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM-binding and tropomyosine-binding domains stabilizes endogenous tropomyosin and microfilaments. *J Cell Biol* 1994; 125: 359-68.

31. Vibert P, Craig R, Lehman W. Three-dimensional reconstruction of caldesmon-containing smooth muscle thin filaments. *J Cell Biol* 1993; 123: 313-21.

32. Gusev NB, Pritchard K, Hodgkinson JL, Marston SB. Filamin and gelsolin influence  $\text{Ca}^{2+}$  sensitivity of smooth muscle thin filaments. *J Muscle Res Cell Motil* 1994; 15: 672-81.

33. Haerberle JR. Calponin decreases the rate of cross-bridge cycling and increases maximum force production by smooth muscle myosin in an *in vitro* motility assay. *J Biol Chem* 1994; 269: 12424-31.

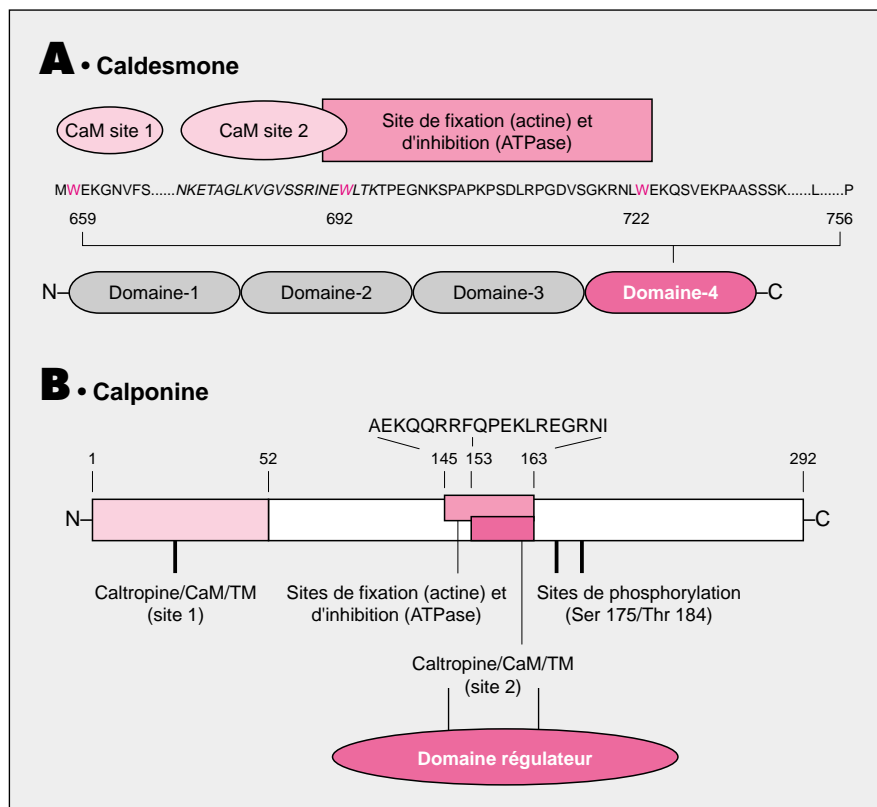


Figure 2. **Diagramme illustrant (A)**, le domaine-4 de la caldesmone de gésier de poulet (résidus 659-756) avec localisation des sites de fixation de la calmoduline et de l'actine et d'inhibition de l'actomyosine-ATPase. Le site de fixation du domaine S2 de la myosine se situerait sur le domaine-1 (résidus 1-170); **(B)**, la calponine du muscle lisse avec la localisation de ses déterminants structuraux et fonctionnels essentiels. Code à une lettre des acides aminés: A : Ala; C : Cys; D : Asp; E : Glu; F : Phe; G : Gly; H : His; I : Ile; K : Lys; L : Leu; M : Met; N : Asn; P : Pro; Q : Gln; R : Arg; S : Ser; T : Thr; V : Val; W : Trp; Y : Tyr.

la calponine de gésier de poulet a été déterminée [16]. Les deux variantes possèdent en commun la partie amino-terminale (résidus 1-216) mais diffèrent par une délétion de 40 acides aminés du côté carboxy-terminal de la forme  $\beta$ . La calponine présente très peu d'analogie structurale avec la caldesmone. Elle possède cependant une analogie forte (69 % de résidus conservés dont 49 % de résidus identiques) avec la SM22 $\alpha$ , protéine extraite du muscle lisse dont la fonction est encore inconnue. Une légère analogie a été relevée entre le domaine régulateur (résidus 144-182) de la calponine et la région inhibitrice (résidus 94-124) de la troponine I du muscle strié ainsi qu'une similitude de séquence avec le segment 24-50 de la protéine Ras p21 qui renferme le site de fixation de la protéine activatrice de la GTPase. La calponine muscu-

laire de 34 kDa a un point isoélectrique de 9,9 qui lui donne un caractère basique contrairement au caractère acide ( $\text{pI} = 5,2$ ) de l'isoforme 36 kDa que nous avons identifiée récemment dans le système nerveux central des mammifères, les neurones hippocampiques et les cellules gliales en culture [17]. La forme basique et la forme acide présentes dans les tissus humains sont issues de deux gènes différents localisés respectivement sur les chromosomes 19p13.1-13.2 et 1p21-22 [18]. La transition des 2 isoformes a lieu au cours de la modulation phénotypique des cellules musculaires lisses vasculaires.

La molécule de calponine est flexible, de forme ellipsoïde (16,2 x 2,6 nm), capable de se lier fortement à l'actine lisse, en l'absence comme en présence de tropomyosine ( $K_d = 4,6 \times 10^{-8}$  M), induisant des changements confor-

mationnels au niveau des protomères d'actine qui se dissocient alors des têtes de myosine. Dans des conditions physiologiques de force ionique (> 110 mM) la stœchiométrie de l'interaction est de 1 calponine pour 2 monomères d'actine. Au-delà de 30% de saturation en calponine, les filaments d'actine forment des faisceaux quelle que soit la force ionique utilisée. La présence d'ATP diminue fortement la constante d'association mais ne change pas la stœchiométrie. La calponine, ajoutée au complexe actine-caldesmone, entre en compétition avec la caldesmone et provoque son déplacement. L'analyse des propriétés du fragment chymotryptique 22 kDa amino-terminal de la calponine et des recombinants sauvages substitués ou délétés ou encore des peptides synthétiques couvrant la majeure partie de cette région a montré que le domaine régulateur de la protéine se situe au niveau d'une séquence minimale de 19 résidus (Ala-145-Ile 163) au sein de l'une des deux régions les plus exposées de la molécule. Ce segment qui renferme les sites de reconnaissance de l'actine, de la calmoduline, de la caltropine et de la tropomyosine, est localisé à proximité des résidus Ser 175 et Thr 184, sites majeurs de phosphorylation *in vitro* par la PKC et/ou la calmoduline-kinase II [9, 19] (figure 2B). On notera aussi le rôle crucial du motif VKYAEK\* dans le pouvoir inhibiteur de l'activité ATPasique du complexe actomyosine puisque sa délétion entraîne l'abolition totale de cette fonction [20]. Au cours du développement embryonnaire, la calponine et la caldesmone-87 kDa sont synthétisées relativement tard par rapport aux autres protéines contractiles (desmine, tropomyosine,  $\alpha$ -actine, myosine, MLCK et filamine) constituant ainsi des marqueurs spécifiques de la différenciation structurale du muscle lisse [21].

## Mécanismes de régulation de l'activité contractile du muscle lisse

### Régulation liée au filament épais

La contraction du muscle lisse (et des cellules non musculaires) est réglée au niveau du filament épais par la

phosphorylation spécifique et réversible des chaînes légères 20 kDa de la myosine sous le contrôle d'une calciprotéine, la calmoduline, et de deux enzymes, une ATP-myosine phosphotransférase, et une phosphatase [8, 9]. La calmoduline (CaM) est une protéine acide ubiquitaire et multifonctionnelle de 16,7 kDa, extrêmement conservée au cours de l'évolution et dont l'importance réside dans son rôle de relais essentiel du message calcique dans un très grand nombre de processus biologiques, dont la contraction musculaire, la motilité cellulaire, le transport axonal, la maturation méiotique, etc. Comme la tropoline C, la calmoduline possède plusieurs domaines en boucle fixant d'une façon ordonnée et séquentielle l'ion calcium nécessaire à sa fonction de régulation et d'activation. La fixation réversible du  $\text{Ca}^{2+}$  sur la molécule induit un changement conformationnel de celle-ci, fait augmenter son contenu en hélice  $\alpha$  et exposer une région hydrophobe qui devient le site privilégié d'interaction de plusieurs protéines cibles ayant une très forte affinité pour la calmoduline. La plus importante de ces protéines au niveau du muscle lisse demeure la kinase des chaînes légères de la myosine (MLCK), une chaîne polypeptidique unique de 110 kDa qui se lie mole à mole à la calmoduline ( $K_d = 10^{-9}$  M). L'augmentation transitoire de la concentration de calcium cytosolique (500-700 nM) active la calmoduline qui s'associe à la MLCK pour former un complexe ternaire actif  $4\text{Ca}^{2+}$ -CaM-MLCK. Lorsque la sérine 19, située dans la partie amino-terminale allongée et flexible de chacune des deux LC20, est phosphorylée par la kinase activée, la myosine subit, probablement à travers le domaine carboxy-terminal de la chaîne légère régulatrice, un changement structural au niveau de la jonction tête-queue qui se transmet au site ATPasique et affecte certaines étapes cinétiques de l'acto-myosine ATPase. A l'état phosphorylé, la myosine est activée par l'actine et induit la contraction. Cette réaction est réversible car, en absence de  $\text{Ca}^{2+}$ , la MLCK devient complètement inactive et une phosphatase endogène spécifique (MLCP), insensible au calcium, hydrolyse alors le groupement phosphorylé attaché à la chaîne légère, entraînant la déphosphoryla-

tion de la myosine et l'inhibition de son activité. A l'état déphosphorylé, la myosine se détache de l'actine et le muscle se relâche. Par ailleurs, la MLCK peut elle-même être le substrat d'une réaction de phosphorylation qui peut s'effectuer *via* la sous-unité catalytique de la kinase dépendante de l'AMP cyclique, ou protéine kinase A. Lorsque la MLCK du muscle lisse est phosphorylée, son affinité pour la calmoduline chute, le complexe actif  $4\text{Ca}^{2+}$ -CaM-kinase ne peut plus se former et la cellule se relâche. La stimulation adrénergique *via* les récepteurs  $\beta$  peut donc réduire la réponse contractile dans le muscle lisse. Ce modèle de régulation, largement admis, est illustré dans la figure 3.

### Régulation liée au filament fin

La phosphorylation exclusive des sous-unités LC20 de myosine est certes un événement initiateur capital dans la régulation de l'état contractile du muscle lisse mais ce processus ne peut à lui seul couvrir et expliquer toutes les propriétés biochimiques et physiologiques de la contraction de ce muscle, et plus particulièrement l'aspect tonique prolongé de celle-ci après déphosphorylation de la myosine. Il semble de plus en plus évident que la relaxation du muscle lisse est plutôt liée à une perturbation de l'interaction de l'actine avec la myosine et que le cycle contraction-relaxation ne peut être le résultat exclusif d'un mécanisme de phosphorylation-déphosphorylation des chaînes légères de la myosine. Comparé à la fixation directe du  $\text{Ca}^{2+}$  sur le système tropomyosine/tropoline du muscle strié où le passage de l'information est instantané, le processus de phosphorylation dans le muscle lisse est relativement lent. Il est généralement compatible avec l'intervalle de temps (quelques centaines de millisecondes) nécessaire au développement d'une tension maximale à peu près égale à celle obtenue dans le muscle squelettique. Bien que l'affinité de l'actine pour la myosine soit presque la même dans les deux types musculaires, la vitesse d'hydrolyse de l'ATP ( $V_{\max}$ ) au cours de la formation du complexe actomyosine est 2 à 3 fois plus faible dans le muscle lisse où les fibres sont spécialisées dans la contraction lente et soutenue requise

\* Val-Lys-Tyr-Ala-Glu-Lys.

## RÉFÉRENCES

34. Kabsh W, Mannherz HG, Suck D, Pai EF, Holms KC. Atomic structure of the actin : DNase I complex. *Nature* 1990 ; 347 : 37-44.
35. Shirinsky VP, Biryukov KG, Hettasch JM, Sellers JR. Inhibition of the relative movement of actin and myosin by caldesmon and calponin. *J Biol Chem* 1992 ; 267 : 15886-92.
36. Nagumo H, Sakaruda K, Seto M, Sasaki Y. Phosphorylation of calponin by PKC is blocked by F-actin *in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun* 1994 ; 203 : 1502-7.
37. Bogatcheva NV, Gusev NB. Interaction of smooth muscle calponin with phospholipids. *FEBS Lett* 1995 ; 371 : 123-6.
38. Novy RE, Lin JLC, Lin JJC. Characterization of cDNA clones encoding a human fibroblast caldesmon isoform and analysis of caldesmon expression in normal and transformed cells. *J Biol Chem* 1991 ; 266 : 16917-24.
39. Matsumura F, Yamashiro S. Tropomyosin in cell transformation. *Cancer Rev* 1986 ; 6 : 21-39.
40. Takahashi K, Takagi M, Ohgami K, Nakai M, Kojima A, Nadel-Ginard B, Shibata N. Inhibition of smooth muscle cell migration and proliferation caused by transfection of the human calponin gene is associated with enhanced cell-matrix adhesion and reduced PDGF responsiveness. *Circulation* 1993 ; 83 : I-174.
41. Romero F, Dusanter-Fourt, Fischer S. La protéine Vav, une mosaïque de domaines de signalisation. *Med Sci* 1997 ; 13 : 629-38.
42. Goetinck S, Waterston RH. The *Caenorhabditis elegans* muscle-affecting gene *unc-87* encodes a novel thin filament-associated protein. *J Cell Biol* 1994 ; 127 : 79-93.
43. Rubbia L, Gabbiani G. Phénotype des cellules musculaires lisses artérielles et athérosclérose. *Med Sci* 1989 ; 5 : 389-95.
44. Appelman HD, Helwig EB. Gastric epitheloid leiomyoma and leiomyosarcoma (Leiomyoblastoma). *Cancer* 1976 ; 38 : 708-28.
45. Borohn RJ, Levine EJ, Olson JO, Mendell JR. Gastric hypomotility in Duchenne muscular dystrophy. *N Engl J Med* 1988 ; 319 : 15-8.
46. Corvol P. L'endothélium, plaque tour-nante de la vasomotricité et de la trophicité de la paroi artérielle. *Med Sci* 1993 ; 9 : 1031-3.
47. Hamet P, Hadrava V, Kruppa U, Tremblay J. Facteurs de croissance et prolifération du muscle lisse vasculaire dans l'hypertension et le diabète. *Med Sci* 1989 ; 5 : 654-61.

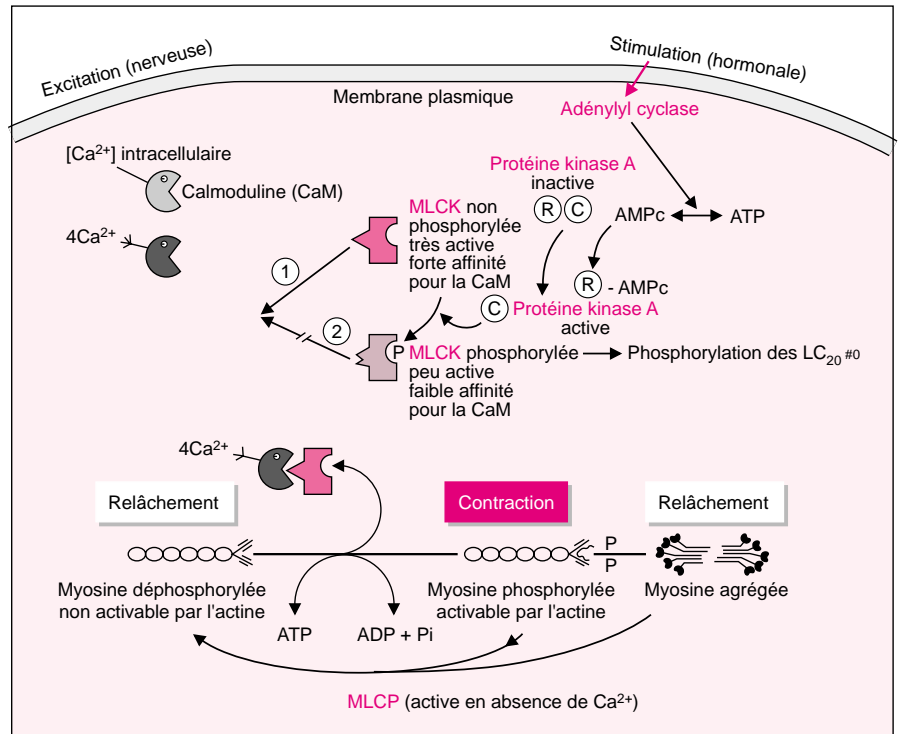


Figure 3. **Représentation schématique du mécanisme de régulation dépendante de la myosine de la contraction-relaxation du muscle lisse.** La contraction et la relaxation du muscle lisse dépendent de la phosphorylation de la chaîne légère de la myosine. Celle-ci est réglée par une kinase spécifique MLCK (myosin light chain kinase) et une phosphatase spécifique MLCP (myosin light chain phosphatase). L'augmentation transitoire de la concentration de calcium cytosolique active la calmoduline qui s'associe à la MLCK pour former un complexe ternaire actif  $4Ca^{2+}$ -CaM-MLCK (situation 1): la chaîne légère de la myosine sera phosphorylée et la fibre musculaire se contractera. L'activité de la MLCK peut, par ailleurs, être inhibée par sa propre phosphorylation sous l'effet de la protéine kinase A activée, par exemple, par la stimulation adrénérgique (situation 2): la MLCK ne peut plus former de complexe avec  $Ca^{2+}$  et calmoduline. La déphosphorylation de la myosine par la MLCP ne sera pas suivie d'une nouvelle phosphorylation. @ et © sont respectivement les sous-unités régulatrice et catalytique de la protéine kinase activée par l'AMP cyclique.

par leur fonction physiologique. En effet, les viscères tels que l'intestin ou la vessie sont appelés à maintenir constant leur tonus musculaire en réponse à la tension pariétale que leur impose le contenu des cavités qu'ils entourent. Cela se fait en consommant un minimum d'énergie, nettement inférieure pour une même tension dans le muscle lisse que celle requise par le muscle squelettique. Pour expliquer le maintien d'un niveau assez élevé de production de force au cours de la baisse de phosphorylation de la myosine, des mécanismes de régulation supplémentaires plus directs et ayant une très forte sensibilité au calcium ont été postulés. Ils

seraient responsables du contrôle de la formation des *cross-bridges* déphosphorylés, caractérisés par un faible taux de cyclage et dénommés *latch-bridges*. Ce phénomène est mécaniquement similaire à l'état de *catch* qu'on observe dans le muscle strié (dit à cliquet) des mollusques et qui permet à la coquille de ces invertébrés de se maintenir fermée avec une dépense infime d'énergie. Les *latch-bridges* sont des têtes de pont faiblement verrouillées qui, en se détachant très lentement de l'actine, conserveraient suffisamment d'énergie pour maintenir une force contractile élevée en dépit d'une baisse à la fois de la concentration du calcium cytosolique, de la



phosphorylation de la myosine, de la vitesse de cyclage du *cross-bridge* et de la consommation d'énergie [22]. Lorsque le  $\text{Ca}^{2+}$  libre dans le cytosol retrouve son niveau normalement bas correspondant à l'état de repos (120-240 nM) et que la myosine déphosphorylée arrive à se dissocier totalement de l'actine, le muscle se relâche complètement. La formation du *latch-bridge* serait donc une phase intermédiaire clé du système contractile lisse, réglée par des protéines dépendantes du  $\text{Ca}^{2+}$  capables de moduler les interactions actine-myosine indépendamment de la phosphorylation de la chaîne légère de la myosine LC20. Parmi les nouvelles protéines sensibles au  $\text{Ca}^{2+}$  et physiquement associées au filament fin naturel, la caldesmone et la calponine sont, dans l'état actuel de nos connaissances, les deux

candidats potentiels pour un tel processus de régulation.

• *La caldesmone*

Histologiquement la caldesmone a été localisée exclusivement dans le domaine de l'actine et de la myosine et sa fonction serait d'assurer la régulation du système actomyosine du muscle lisse en inhibant l'activité Mg-ATPase du complexe actomyosine sans modifier le niveau de phosphorylation des chaînes légères de la myosine. Toutefois son mode d'action inhibiteur n'est pas entièrement clair. Pour certains, la caldesmone agirait en réduisant, par blocage stérique, l'interaction de l'actine avec la myosine-ATP et la myosine-ADP.Pi, et serait donc capable de déplacer de manière compétitive le complexe de liaison faible myosine-ATP de l'actine

en présence ou en absence de tropomyosine [23] ; pour d'autres, au contraire, la caldesmone altérerait, en présence de tropomyosine, la vitesse de certaines étapes cinétiques de l'actomyosine-ATPase après la liaison de la tête globulaire de myosine à l'actine [24]. Son action au niveau de l'étape de formation de l'ADP-Pi semble en effet diminuer la vitesse de l'hydrolyse de l'ATP ( $V_{\max}$ ), et donc la libération du phosphate inorganique, sans affaiblir la fixation de la myosine à l'actine ( $K_{\text{ATPase}}$ ). C'est d'ailleurs par un mécanisme similaire qui affecte l'état catalytique de la réaction que le système troponine-tropomyosine assure la régulation de la contraction des muscles squelettique et cardiaque chez les vertébrés (figure 4). L'inhibition de l'actomyosine-ATPase par la caldesmone peut être levée

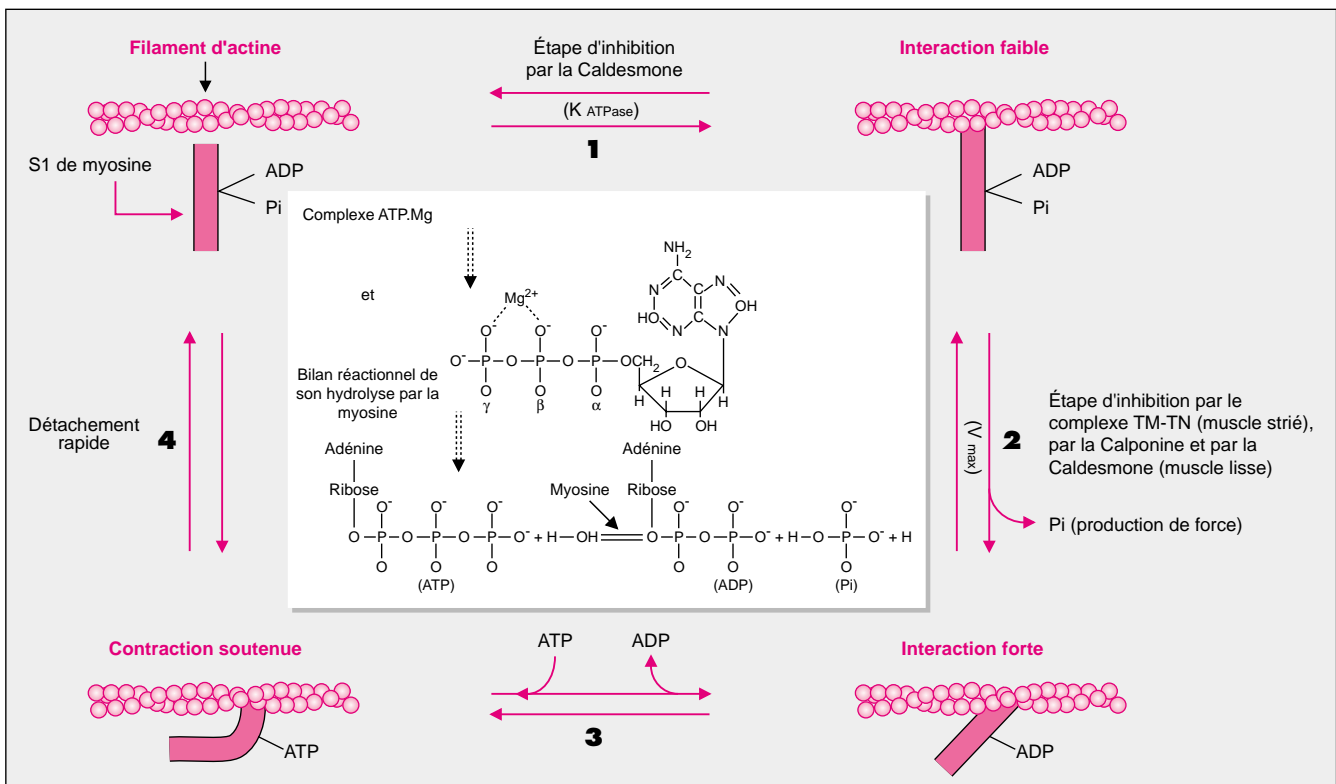


Figure 4. **Cycle général d'hydrolyse de l'ATP-Mg par la myosine et étapes particulières contrôlées par les protéines associées au filament fin dans le muscle lisse.** **Étape 1 :** interaction de l'intermédiaire S1-ADP.Pi avec l'actine et formation du complexe de liaison faible Actine-S1-ADP.Pi. **Étape 2 :** conversion du complexe faiblement lié Actine-S1-ADP.Pi en complexe fortement lié Actine-S1-ATP ; la libération du Pi est couplée à la production de la force contractile. Cette étape peut être inhibée par le complexe tropomyosine-troponine dans le muscle strié et par la calponine et la caldesmone dans le muscle lisse [24]. **Étape 3 :** libération de l'ADP et liaison de l'ATP pour produire le complexe transitoire Actine-S1-ATP. **Étape 4 :** dissociation du complexe Actine-S1 et retour à l'étape 1. La caldesmone, par son aptitude à se lier à la fois à l'actine et à la queue fibrillaire de la myosine, empêcherait cette dissociation et formerait ainsi une tension soutenue de la fibre sans dépense d'énergie [23].  $K_{\text{ATPase}}$  : constante d'affinité de la myosine pour l'actine. **Encadré :** réaction d'hydrolyse de l'ATP par la myosine.

après association de celle-ci à la calmoduline saturée en calcium. Cette réactivation ATPasique peut avoir lieu avant même que le complexe actine-caldesmone ne soit totalement dissocié. La présence, à côté du site régulateur situé sur le domaine-4 de la caldesmone, d'un deuxième site de plus faible affinité, permet la liaison d'une seconde molécule de calmoduline, favorisant la dissociation du complexe actine-caldesmone [14]. On remarquera, cependant, que la forte quantité de calmoduline nécessaire pour détacher complètement la caldesmone de l'acto-tropomyosine n'est pas physiologique (excès molaire de 25 fois) et que d'autres protéines dépendantes du  $Ca^{2+}$  pourraient être plus efficaces dans la levée ou la perturbation de l'action inhibitrice de la caldesmone. Ces protéines peuvent agir, soit directement en se fixant sur la caldesmone, soit indirectement en induisant l'agrégation des filaments d'actine, réprimant ainsi l'effet inhibiteur de la caldesmone. Parmi ces calciprotéines, on retrouve la protéine S-100 et la caltropine. Cette dernière (10 mg/350 g de tissu frais) est un dimère de masse moléculaire 21 kDa à l'état natif, capable de fixer 2 moles de  $Ca^{2+}$  par sous-unité. La caltropine se lie mole à mole à la caldesmone, dans une région proche de la Cys-580, affecte sa conformation et affaiblit fortement son interaction avec la myosine et l'actine, restaurant la totalité de l'activité actomyosine ATPasique. L'affinité de la caltropine pour la caldesmone ( $K_d = 2 \times 10^{-7}$  M) est au moins 10 fois supérieure à celle de la calmoduline et le complexe  $Ca^{2+}$ -calmoduline/caldesmone peut, à cet égard, perdre toute signification biologique [25]. L'activité inhibitrice de la caldesmone peut aussi être abolie par sa propre phosphorylation au moyen de diverses kinases cellulaires (figure 5). En effet, *in vitro*, la caldesmone isolée constitue un excellent substrat pour les protéines kinases C et A, la  $Ca^{2+}$ -CaM kinase II, la caséine kinase II, la MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) et la p34<sup>cdc2</sup> kinase [15, 26]. La caséine kinase II a été aussi identifiée comme une kinase endogène majeure de la caldesmone après stimulation de l'aorte de mouton par divers antagonistes (phorbol dibutyrate, par exemple). L'incorporation du phosphate se fait de préfé-

rence sur des séquences Ser/Thr-Pro du domaine carboxy-terminal proches des sites de l'actine et de la calmoduline confinés dans la séquence Asn 675-Trp 722 [14]. La phosphorylation de la caldesmone par la PKC entraîne une baisse de l'affinité de celle-ci pour l'actine et la levée de l'inhibition de l'activité actomyosine-ATPase. Quant à la phosphorylation catalysée par la caséine kinase II, elle s'effectue sur la Ser 73 et la Thr 83 de l'extrémité amino-terminale de la molécule proche du site de liaison de la myosine. La phosphorylation de la caldesmone par la caséine kinase II ne dissocie pas la caldesmone de l'actine mais abolit son interaction avec la myosine, permettant à la caldesmone de moduler sa capacité de pontage des filaments fins et épais. Le S2 de la myosine et la région 1-12 de l'actine sont des sites privilégiés de fixation de la caldesmone et l'inhibition de l'actomyosine-ATPase pourrait bien s'expliquer par le blocage de l'accès direct de la

myosine à la région amino-terminale de l'actine dont les charges négatives semblent indispensables à l'activation de la myosine Mg-ATPase. De plus, la capacité de la caldesmone d'assembler et de stabiliser des filaments de myosine déphosphorylée en présence de Mg-ATP [27] qui expliquerait la détection possible de la forme 6S dans le muscle au repos, ou de ponter simultanément les filaments fins (actine) aux filaments épais (myosine) *via* ses deux extrémités amino- et carboxy-terminales, devrait jouer un rôle essentiel dans l'état de *latch* en imposant aux éléments filamenteux de la cellule une orientation spatiale particulière conduisant à plus d'efficacité dans l'activité contractile du muscle lisse en réponse à une stimulation hormonale ou nerveuse. La signification biologique de l'interaction caldesmone-tropomyosine est toujours mal comprise. Des études effectuées *in vitro* et *in vivo* ont montré que ce complexe augmente l'affinité de chacune des deux compo-

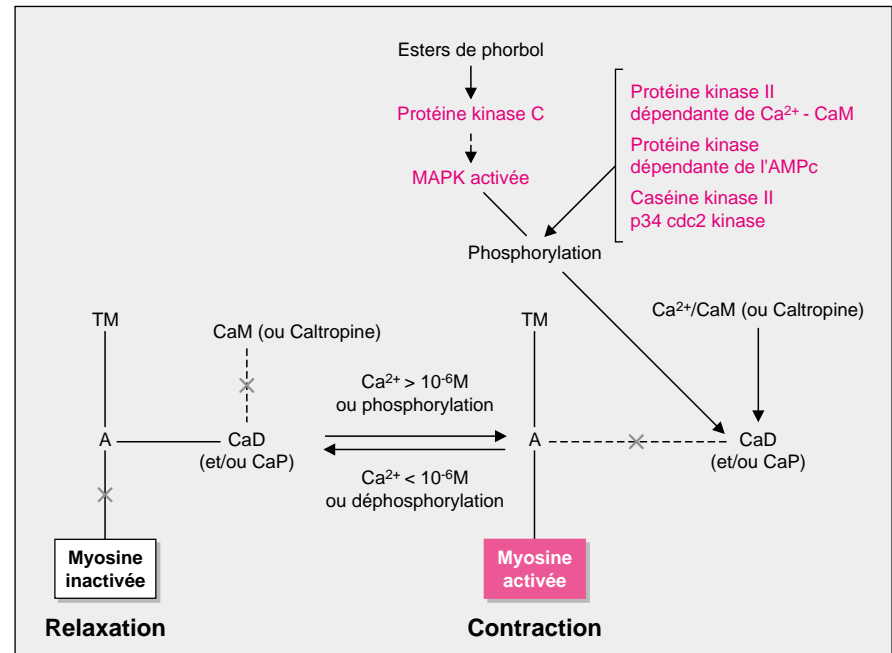


Figure 5. **Mécanisme de régulation de la contraction du muscle lisse par les protéines associées au filament fin d'actine.** La caldesmone assure la régulation du système actomyosine du muscle lisse en inhibant l'activité Mg-ATPasique du complexe actomyosine; cette inhibition est levée après son association à la calmoduline (ou à la caltropine) saturée en calcium. Elle peut aussi être abolie par la phosphorylation de la caldesmone par diverses kinases cellulaires. La MAPK (protéine kinase activée par mitogène) a été identifiée dans le tissu musculaire lisse et son activation via une cascade d'enzymes induirait la phosphorylation *in vivo* de la caldesmone. CaM: calmoduline; CaD: caldesmone; CaP: calponine; TM: tropomyosine; A: actine.

santes pour l'actine, assignant aux microfilaments une plus grande protection contre l'effet de fragmentation possible des protéines spécifiques telles que la gelsoline dont nous avons montré la présence en quantité importante dans le muscle lisse [28, 29]. La stabilisation renforcée des microfilaments observée lors de la sur-expression de la caldesmone dans les fibroblastes confirme le rôle structural que pourrait avoir la caldesmone dans les cellules musculaires et non musculaires [30]. Il a été suggéré qu'*in vitro* la tropomyosine influence nettement la fonction de la caldesmone, probablement en favorisant, à partir d'un site fort de contact entre l'actine et la caldesmone, la propagation du signal inhibiteur de celle-ci le long du filament fin à travers plusieurs monomères d'actine. La reconstruction tridimensionnelle des filaments fins du muscle lisse a en effet montré que la présence de caldesmone peut affecter la position de la tropomyosine et son mouvement par rapport à l'actine, expliquant sa capacité de moduler l'actomyosine-ATPase et de régler l'état contractile du muscle autrement que par simple encombrement stérique [31]. Ce changement de conformation peut être bloqué et l'inhibition levée par la fixation d'une quantité stœchiométrique de  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM. Cependant, la neutralisation complète de l'action de la caldesmone sur l'actine nécessite un excès molaire très élevé de calmoduline à moins que d'autres facteurs protéiques, filamine et/ou gelsoline, puissent contribuer à la potentialisation *in vivo* de l'effet de la  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM dans la dissociation du complexe et la levée totale de l'inhibition [32].

#### • La calponine

Comme la caldesmone, la calponine est capable d'inhiber en solution l'activité Mg-ATPase de l'actomyosine du muscle lisse, mais aussi d'induire des changements conformationnels au sein de l'actine F (actine filamentueuse) et de stopper, au cours d'essais de motilité effectués *in vitro*, le mouvement des filaments d'actine sur la myosine phosphorylée [33]. L'interaction de la calponine avec le segment carboxy-terminal (résidus 326-355) de l'actine révélée par pontage chimique à la carbodiimide suggère une liaison spécifique du domaine inhibiteur de

la calponine (résidus 145-163) à cette région particulière de l'actine où la séquence Pro 332-Glu 334 a été présentée comme un point de contact majeur dans l'interface actine-tête de myosine [4, 19]. L'association hydrophobe de la calponine avec cette région rendrait bien compte de son aptitude à dissocier le complexe *rigor* actine-S1 et à inhiber l'actomyosine-ATPase en bloquant l'étape cinétique de transition du complexe faible actine-S1-ADP.Pi vers le complexe fort actine-S1-ADP. Le site d'ancrage de la calponine sur la portion carboxy-terminale de l'actine [19] est très éloigné dans la séquence de l'actine de celui de la caldesmone: celui-ci se situe sur la partie amino-terminale de l'actine [13], et représente aussi le site de reconnaissance des complexes intermédiaires S1-nucléotides [4]. Ces deux sites sont néanmoins spatialement très proches l'un de l'autre au vu de la structure tridimensionnelle de la molécule d'actine [34]. A l'inverse de la caldesmone dont l'action inhibitrice est graduée (car dépendante de la concentration de la caldesmone) et renforcée par la présence de la tropomyosine (il faut 5 à 10 fois plus de caldesmone en absence de tropomyosine), la calponine semble agir sur le mouvement de glisse du filament d'actine, d'une façon «tout ou rien» et indépendamment de la tropomyosine, probablement en inhibant une étape décisive au sein du cycle ATPasique de la myosine [35].

La calponine ne fixe pas directement le calcium, mais l'effet inhibiteur qu'elle exerce sur l'actomyosine-ATPase peut être levé comme dans le cas de la caldesmone par un ajout substantiel de  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM ou d'une quantité stœchiométrique de caltropine [19, 25]. La phosphorylation rapide de la calponine observée au cours de la contraction du muscle de la trachée ou de l'estomac, marquée par voie métabolique au  $^{32}\text{Pi}$ , et stimulée par le carbachol ou l'endothéline-1, suggère la présence dans ces tissus d'un système de régulation longtemps controversé, celui de la phosphorylation/déphosphorylation *in vivo* de la calponine. Une protéine phosphatase endogène du type 2A qui déphosphoryle rapidement et spécifiquement la calponine a même été purifiée [9]. Cependant, Nagumo *et al.* ont démontré récemment que

la présence de l'actine F empêche la phosphorylation *in vitro* de la calponine [36]. Il est donc difficile d'imaginer qu'*in vivo* la calponine se laisse phosphoryler avant sa dissociation préalable de l'actine. La question de la signification physiologique de la phosphorylation de la calponine demeure donc posée.

Enfin, des auteurs avaient suggéré la présence d'un mécanisme supplémentaire de contrôle de la phase soutenue de la contraction artérielle lié à l'activation de la PKC suivie de la phosphorylation de plusieurs protéines appartenant au domaine cytosquelettique «filamine-actine-desmine». L'organisation structurale du réseau filamentaire intermédiaire rend compte des tensions mécaniques exercées par les mouvements tissulaires et permet de maintenir la cohésion des cellules musculaires au cours de la contraction. La phosphorylation *in vitro* de la desmine provoque le désassemblage des filaments intermédiaires et l'on postule qu'*in vivo* ce phénomène de dissociation serait responsable de grands changements dans la configuration de ces structures filamenteuses, produisant ainsi la tension élevée qui se manifeste au cours de la contraction prolongée du muscle artériel au prix d'une dépense d'énergie minime. Par ailleurs, la localisation de la calponine, à la fois dans le domaine contractile et, à une concentration plus élevée dans le domaine cytosquelettique de la cellule, favoriserait l'intervention de cette protéine dans le mécanisme dépendant du  $\text{Ca}^{2+}$  de la gélation *in situ* des filaments d'actine par la filamine. En outre, l'interaction *in vitro* de la desmine avec la calponine a été observée (nos travaux en cours et communication personnelle de Gusev NB). Ce rôle modulateur de la visco-élasticité du cytosquelette serait plus difficile pour la caldesmone dont la distribution est limitée au seul domaine contractile, dépourvu de filamine et de desmine [2, 3]. Plus que la caldesmone, la calponine semble donc pouvoir exercer un double rôle: structural au niveau de la réorganisation du cytosquelette, notamment dans les tissus non musculaires, et fonctionnel, dans le maintien de la tension observée *in vivo* au cours de la contraction isotonique du muscle lisse. Enfin, la calponine arbore au niveau de sa

région amino-terminale de 13kDa un site fort d'interaction avec les phospholipides [37]. Toutes ces interactions renforcent l'idée d'une participation active de la protéine dans la perturbation de la bicouche lipidique, la transmission du signal et l'ancrage des filaments d'actine au niveau de la membrane cellulaire, au même titre que d'autres protéines associées à l'actine telles que l' $\alpha$ -actinine, la vinculine et la filamine.

### Quelques aspects de la pathologie du muscle lisse

L'altération du système filamentaire à travers des changements dans l'expression, l'organisation ou l'activation de protéines contractiles qui le composent (caldesmone, tropomyosine, calponine, desmine ou l'isoforme  $\alpha$  de l'actine lisse) constitue un aspect important du processus de transformation dans une cellule. L'action coopérative stabilisatrice et protectrice de la caldesmone et de la tropomyosine vis-à-vis du filament fin d'actine, par exemple, est considérée comme critique pour l'intégrité structurale du cytosquelette et la chute simultanée du taux de synthèse de ces deux protéines dans des cellules cancéreuses provoquerait la réorganisation des microfilaments observée au cours de la transformation cellulaire [38, 39]. De plus, Takahashi *et al.* [40] avaient décrit récemment la calponine comme un important facteur de contrôle dans la prolifération cellulaire. En effet, la transfection du gène de la calponine dans des cellules artérielles en culture, inhibe remarquablement leur hyperplasie. Cette propriété d'un gène suppresseur de tumeur serait liée à l'analogie de séquence qui existe entre la partie fonctionnelle amino-terminale de la calponine et une région d'une protéine codée par l'oncogène Vav [41]. Les résultats rapportés par ces auteurs soulignent qu'une réduction dans l'expression de la calponine serait un événement-clé dans le début et la progression de l'athérosclérose et que la transfection génique de la calponine humaine pourrait se révéler un moyen thérapeutique efficace contre la resténose. Par ailleurs, la mutagenèse de la protéine unc-87 de *C. elegans* qui possède cinq copies d'un motif répétitif conservé de

30 acides aminés de la région carboxy-terminale de l'isoforme  $\alpha$ -calponine humaine engendre une paralysie musculaire chez l'animal [42]. Les activités prolifératives, migratoires, synthétiques et de différenciation des cellules musculaires lisses, ainsi que la désorganisation de l'architecture cytosquelettique de ces cellules, peuvent être à l'origine de plusieurs affections plus ou moins graves telles que la formation des plaques athéromateuses, les anémies hémolytiques ou encore les tumeurs bénignes (hyperplasie myoïde, léiomyomes) ou malignes (léiomyosarcomes) qu'on rencontre généralement au niveau de l'estomac, du larynx et de l'utérus [43, 44]. Les troubles de la motricité gastro-intestinale relevés chez des enfants atteints de myopathies de Duchenne ou de Becker se manifestent par le ralentissement du transit dû probablement à l'absence de la dystrophine et/ou à une perturbation dans l'agencement et la stabilisation des glycoprotéines associées situées au niveau des *caveolae* et qui seraient impliquées dans le renforcement de la membrane plasmique et le contrôle de l'homéostasie calcique [45]. L'absence de dystrophine dans les vaisseaux sanguins d'enfants myopathes ne semble pas, en revanche, entraîner de troubles vasculaires car l'utrophine, plus abondante que la dystrophine dans ces tissus à l'état normal, jouerait un rôle compensatoire dans le maintien de l'intégrité membranaire et d'éventuels phénomènes de transmission de signaux. Dans un état physiologique normal, la tonicité vasculaire et la trophicité de la paroi artérielle sont modulées par des substances vasoactives relaxantes (monoxyde d'azote, par exemple) ou contractantes (endothéline, par exemple) [46]. Cependant, le mécanisme de *latch contraction* qui caractérise cette tonicité à l'état de repos musculaire impliquerait une multitude de protéines dépendantes du  $Ca^{2+}$ . Cela explique l'effort considérable consenti ces dernières années pour tenter de comprendre ce nouveau système de régulation musculaire qui nécessite, dans un premier temps, l'identification et l'analyse des différents constituants myogéniques potentiellement responsables du remaniement fibreux de la paroi artérielle et de son hypertrophie. Ainsi, aux fac-

teurs génétiques et de croissance qui contribuent activement à la multiplication anormale des cellules du muscle lisse vasculaire et au déséquilibre de l'homéostasie de leur paroi [47], doit s'ajouter l'effet des composants protéiques de structure qui, une fois déstabilisés, pour quelque raison que ce soit, induisent un désordre cytosquelettique qui pourrait être fatal. La diversité histologique du muscle lisse, l'absence de troponines (protéines régulatrices-clés dans le muscle strié) et la complexité du mode d'action des vagues calciques transmembranaires en relation avec des protéines intracellulaires cibles font que malgré des progrès substantiels enregistrés ces dernières années, tant sur le plan de la biochimie que de la biologie moléculaire et de la génétique des principales protéines du système contractile musculaire, on commence à peine à déchiffrer le code dont s'est doté ce tissu pour exprimer et régler ses performances mécaniques. La dissection de la dynamique structurale et fonctionnelle des macromolécules biologiques seules ou en interactions avec d'autres facteurs et la détermination de leur rôle physiologique passe impérativement par la mise en œuvre d'une variété de techniques complémentaires sophistiquées englobant la cristallographie, la spectroscopie RMN à haut champ, la synthèse peptidique, la modélisation moléculaire, la mutagenèse dirigée et la transgénèse. Cette dernière représente l'un des défis majeurs de demain auquel nous nous efforçons de répondre dès à présent dans notre laboratoire. Comprendre les mécanismes fondamentaux qui régissent la contractilité musculaire et ses altérations pourrait à terme permettre l'élaboration de thérapeutiques originales d'un grand nombre de maladies humaines: asthme, diabète, hypertension, athérosclérose, infarctus... ■

#### Remerciements

L'auteur remercie tous ses amis et collaborateurs de l'équipe « transduction d'énergie » et plus particulièrement R. Kassab, P. Travo et J. Demaille pour les critiques et suggestions apportées au cours de la rédaction du manuscrit. Les travaux mentionnés dans cette revue ont bénéficié du soutien financier du Cnrs, de l'Inserm et de l'AFM (Association française contre les myopathies).



## Summary

### Contractile events in smooth muscle cells

Muscle contraction is driven by a cyclical interaction between the globular head domain of myosin and the actin filament, coupled to the breakdown of ATP. In vertebrate smooth muscle, it is generally accepted that actomyosin ATPase and consequently tension generation are regulated primarily by the reversible phosphorylation of the 20 kDa myosin light chain. However, current studies have suggested that the simple on/off system based on myosin phosphorylation is not sufficient to explain all the aspects of the contractile activity of smooth muscle, specifically as concerns the tonic responses in the slow cycling, termed «latch-bridge», characteristic of sustained isometric force production. Today, it is thought that caldesmon and calponin, two thin-filament proteins discovered in the 1980's, are the two major elements required in the mechanism of  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent tension maintenance without detectable elevation in phosphorylation, especially in vascular smooth tissue. Both of these proteins can bind to all the major proteins that make up the actomyosin system (actin, myosin, tropomyosin, etc.) and inhibit the actin-activated Mg-ATPase activity of myosin. This inhibitory action can be reversed upon their interaction with EF-hand Ca-dependent proteins such as calmodulin, caltropin and S-100, or through changes in their phosphorylation state. Further, investigations of the properties of caldesmon and calponin *in vitro* and *in vivo* have led to the conclusion that these proteins are likely to be involved in an actin-linked  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitive secondary regulatory process operating in the smooth muscle contractility mechanism, independent of the well established myosin phosphorylation system. The interplay between the thick and thin filament-based regulatory systems may explain some of the properties unique to smooth muscle cells, in particular the phenomena of the latch state.



Bayard Éditions  
Sciences Médecine  
ISBN 2.227.13700.1  
125 FF

**Q**uelle médecine demain, et pour quels malades ? Que penser des progrès récents, par exemple dans le domaine de la médecine prédictive, des thérapies géniques, des interventions sur l'embryon humain ? Quelles en seront les conséquences pour l'homme et la société ? Pourra-t-on longtemps résister à la tentation de l'eugénisme ? Autant de questions cruciales sur lesquelles Axel Kahn livre ses réflexions d'homme de science critique.

**Médecin généticien, directeur de recherche à l'Inserm, Axel Kahn est membre du Comité national consultatif d'éthique et, depuis plus de dix ans, rédacteur en chef de la revue médecine/sciences. Dominique Rousset est journaliste et anime en particulier l'émission « Enjeux internationaux » sur France Culture.**