

Recaptage ou relargage ? Ou les caprices de la signalisation calcique du myocyte dans l'hypertrophie et l'insuffisance cardiaques

Il est des articles prestigieux mais attendus. On en connaît le résultat par avance et malgré une qualité que personne ne conteste et les indiscutables progrès qu'ils font faire à nos connaissances, ils ne constituent malgré tout qu'une petite pierre de plus dans un édifice conceptuel sans surprise et souvent étonnamment consensuel. Il en est d'autres, plus rares, qui remettent en question ces beaux montages, amenant à en reconsidérer les fondations et finalement, tout l'équilibre. L'article de Gomez *et al.* (Baltimore, MD, USA) [1] dans le numéro du 2 mai de *Science* appartient sans aucun doute à cette deuxième catégorie. Grâce à une série d'expériences élégantes qu'autorise une technologie de pointe, il fait souffler un courant d'air frais sur la physiopathologie cellulaire cardiaque. Le courant d'air passé, le paysage n'est plus tout à fait le même ou, plutôt, c'est notre œil qui voit différemment non seulement le panorama dans son ensemble mais aussi chacun des éléments qui l'ont progressivement composé. L'article de Gomez *et al.* [1] montre en effet que les anomalies de la signalisation calcique du myocyte cardiaque, responsables d'une part importante de la dysfonction contractile du myocarde lors des cardiopathies, pourraient être liées non pas à l'altération des mécanismes de recaptage du calcium (Ca^{2+}) dans le réticulum sarcoplasmique mais à une perturbation de la transmission du signal entre les canaux calciques du sarcolemme (encore appelés DHPR pour récepteurs des dihydropyridines) et ceux du réticulum sarcoplasmique (appelés RyR pour récepteurs de la ryanodine).

La contraction du myocyte cardiaque

Pour bien saisir l'originalité de l'article de Gomez *et al.* [1], il faut rappeler brièvement les bases de la contraction du myocyte cardiaque. Son activité se distingue de celle des autres myocytes, notamment ceux des muscles du squelette, par l'alternance régulière, plusieurs dizaines à plusieurs centaines de fois par minute selon l'espèce animale, d'une phase de contraction responsable de la systole cardiaque et d'une phase de relaxation responsable de la diastole. Cela est rendu possible, d'une part, par l'organisation tissulaire du myocarde où les myocytes reçoivent tous, plus ou moins simultanément, un signal de dépolarisation provenant de cellules douées d'une dépolarisation automatique (cellules du nœud sinusal) et, d'autre part, par l'organisation architecturale de chaque myocyte qui permet une interaction entre le sarcolemme, siège de la dépolarisation, et le réticulum sarcoplasmique, réservoir du Ca^{2+} nécessaire au déclenchement de la contraction au niveau du sarcomère. Le signal de la vidange du réticulum sarcoplasmique est lié à l'entrée dans la cellule à travers les canaux calciques de type L (les DHPR) lors de la dépolarisation membranaire, des ions Ca^{2+} qui, lorsqu'il se lient aux canaux du réticulum sarcoplasmique (les RyR), déclenchent leur ouverture. Cette vidange du réticulum sarcoplasmique entraîne une brusque et importante variation de la concentration de Ca^{2+} libre intracytosolique $[\text{Ca}^{2+}]_i$ qui peut être enregistrée par des indicateurs fluorescents pour le Ca^{2+} , réalisant ainsi un signal encore

appelé « transitoire calcique » qui présente un pic initial suivi d'une décroissance progressive (*figure 1A*). Contrairement à la contraction, la relaxation n'est pas déclenchée par un signal aussi précis. Elle est plus progressive, essentiellement liée à l'action d'une Ca^{2+} -ATPase appelée SERCA (pour *sarco-endoplasmic reticulum calcium-ATPase*) qui pompe le Ca^{2+} dans le réticulum sarcoplasmique contre un gradient de concentration et dont l'activité est fortement stimulée par l'augmentation de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ qui suit la vidange du réticulum sarcoplasmique.

Jusqu'à ces dernières années, l'idée était que le Ca^{2+} qui entre dans le myocyte par les DHPR entraîne une augmentation globale de $[\text{Ca}^{2+}]_i$, en particulier au voisinage des citernes terminales du réticulum sarcoplasmique (*figure 2A*). Cette augmentation, quand elle atteint un certain seuil, entraîne l'ouverture des RyR, ce qui permet la vidange du réticulum sarcoplasmique et ainsi le « relargage » du Ca^{2+} dans le cytosol, dans un espace de diffusion commun au Ca^{2+} qui entre dans la cellule par les DHPR et à celui qui est relargué du réticulum sarcoplasmique par les RyR (notion de « *pool commun* ») [2]. Or si tel était le cas, la vidange du réticulum sarcoplasmique devrait répondre à une loi de type « tout ou rien », la toute première libération de Ca^{2+} à partir du réticulum sarcoplasmique, même partielle et localisée, devant entraîner, de proche en proche, la vidange de tout le réticulum sarcoplasmique, rendant ainsi le système non modulable (*figure 2A*). Or il n'en est rien puisque l'importance de la vidange du réticulum sarcoplasmique est finement modulée

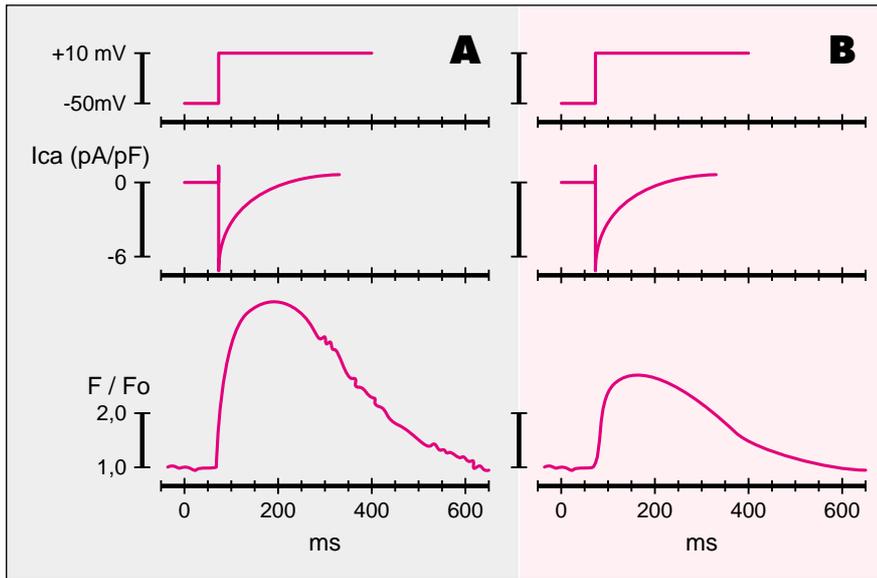


Figure 1. **Modification du signal calcique enregistré dans un myocyte isolé du ventricule d'un rat hypertendu (B : capacité membranaire (C_m) = 273,44pF) comparé à celui d'un myocyte témoin (A : C_m = 153,8 pF).** Tracé supérieur: potentiel membranaire; tracé intermédiaire: densité du courant calcique I_{Ca} ; tracé inférieur: signal de fluorescence (F), normalisé par rapport au signal mesuré avant la dépolarisation. Noter la diminution du signal calcique en B malgré l'absence de modification d' I_{Ca} . Adapté de [1].

par la quantité de Ca^{2+} qui entre dans la cellule par les DHPR [3].

Cette contradiction apparente du couplage excitation-contraction des myocytes cardiaques a amené très tôt [4] à l'idée de l'existence d'un contrôle local du processus d'activation du réticulum sarcoplasmique par le Ca^{2+} [5]. La nature de ce contrôle local était mal connue et débattue jusqu'au développement récent des nouvelles techniques de microscopie confocale à haute résolution temporelle et spatiale. Ces techniques ont permis de montrer que la vidange du réticulum sarcoplasmique est, en fait, la sommation de multiples événements élémentaires qui sont des variations localisées et très transitoires de $[Ca^{2+}]_i$ appelées « étincelles calciques »; elles correspondent à l'activation de quelques RyR localisés à proximité des tubules t, c'est-à-dire au contact des DHPR (figure 2B). Plus l'activité de ces derniers est élevée, plus le nombre d'étincelles calciques augmente par recrutement d'un plus grand nombre de RyR, permettant ainsi au système d'être modulable [6, 7].

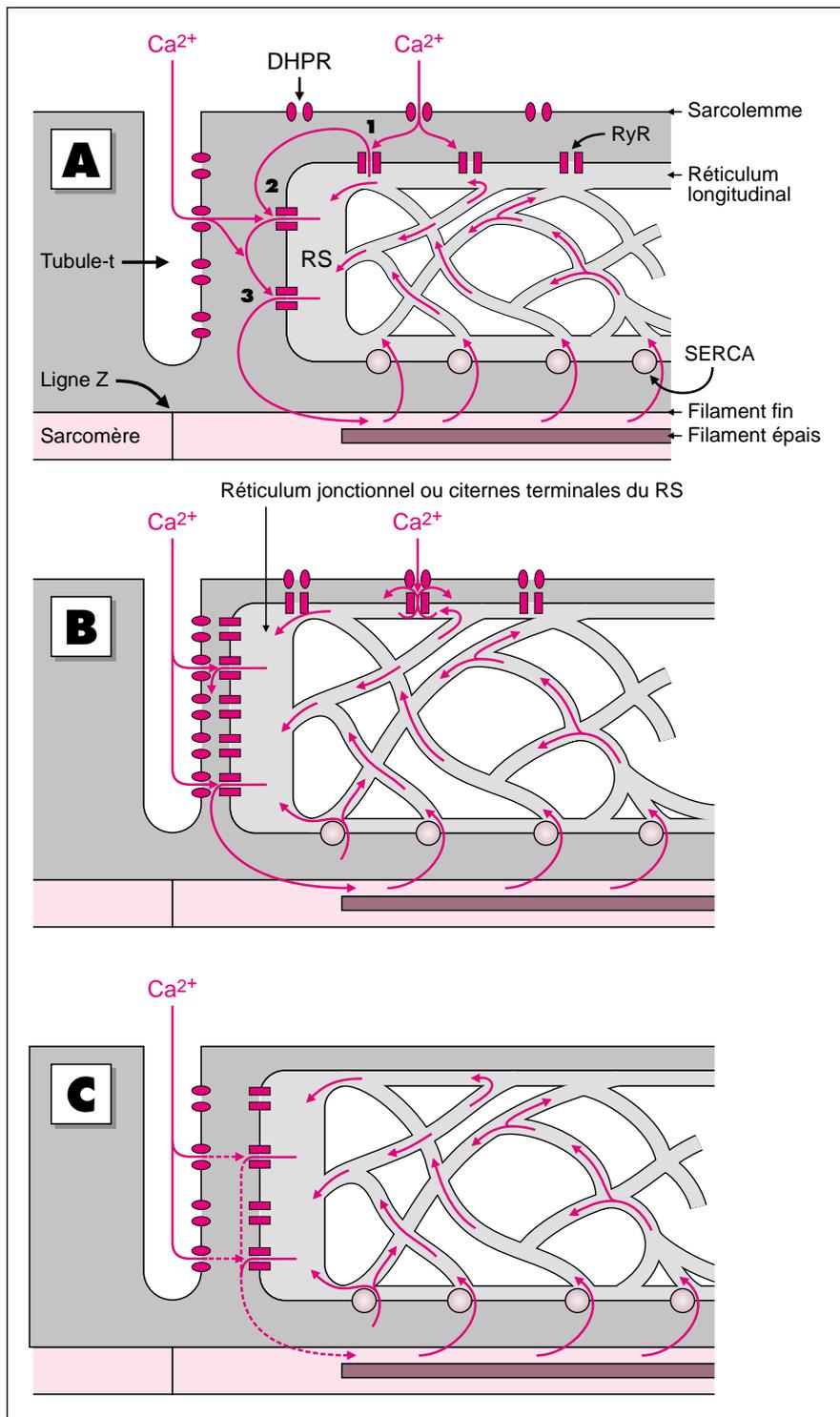
Contrôle local du couplage excitation-contraction

L'article de Gomez *et al.* [1] étudie précisément ces mécanismes du contrôle local du couplage excitation-contraction dans deux modèles de cardiopathie chez le rat, l'un au stade encore compensé, c'est-à-dire avant l'apparition des signes d'insuffisance cardiaque, l'autre au stade de l'insuffisance cardiaque avérée. Les anomalies de la signalisation calcique du myocyte cardiaque à ces deux stades des cardiopathies font l'objet, depuis plus d'une dizaine d'années, de très nombreuses recherches. On sait depuis le milieu des années 1980 que la signalisation calcique des myocytes cardiaques est altérée au cours des cardiopathies. Dans plusieurs études réalisées à partir de cœurs défaillants humains ou animaux, le signal calcique présente une amplitude plus ou moins diminuée (figure 1B) et, selon les études, sa durée est plus ou moins prolongée [8-10]. Plus précisément, la décroissance du signal calcique semble survenir plus tardivement et

surtout de façon moins rapide. Ces observations ont attiré l'attention sur la possibilité d'une altération de la fonction de recaptage du Ca^{2+} dans le réticulum sarcoplasmique, d'autant que l'altération de cette fonction avait été montrée antérieurement à partir de préparations membranaires [11]. Le clonage des ADNC de SERCA et l'utilisation d'anticorps spécifiques couplée à la mesure de la fonction de SERCA a, depuis la fin des années 1980, permis de mesurer une diminution de l'expression et de la fonction de SERCA dans de nombreuses situations d'hypertrophie et d'insuffisance cardiaque chez l'animal comme chez l'homme [12, 13]. Cela a conduit à une vision un peu réductrice selon laquelle les altérations de la signalisation calcique du myocyte cardiaque et de la fonction du réticulum sarcoplasmique dans les cardiopathies sont essentiellement le fait d'une perturbation du recaptage du Ca^{2+} dans le réticulum sarcoplasmique, cela malgré l'existence d'éléments discordants sur lesquels nous reviendrons dans un article ultérieur et de données moléculaires faisant jouer un rôle à une modification de la synthèse des protéines impliquées dans le relargage du Ca^{2+} [14, 15]. De façon tout à fait intéressante, l'article de Gomez *et al.* [1] fait encore un peu plus basculer l'intérêt, au moins pour un temps, de la dysfonction des mécanismes de recaptage à celle des mécanismes de relargage du Ca^{2+} par le réticulum sarcoplasmique et, surtout, d'aspects uniquement moléculaires vers des aspects concernant la physiologie et l'architecture du myocyte.

Couplage excitation-contraction dans les cardiopathies

Les expériences ont été réalisées sur des myocytes isolés du ventricule hypertrophié de rats spontanément hypertendus qui ne présentent pas encore (rats Dahl dont l'hypertension est dépendante d'un régime riche en NaCl) ou qui, au contraire, présentent des signes d'insuffisance cardiaque (rats SH-HF de 17 à 18 mois, spécialement élevés pour l'insuffisance cardiaque). Sans trop entrer dans le détail des techniques et des



◀ **Figure 2. Couplage excitation-contraction des myocytes cardiaques.** **A :** dans l'ancienne théorie dite du « pool commun », l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ liée à l'entrée de Ca^{2+} par les récepteurs des dihydropyridines (DHPR) entraîne l'ouverture des récepteurs de la ryanodine (RyR) (1); la vidange du Ca^{2+} stocké dans le réticulum sarcoplasmique (RS) qui en résulte participe à l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ (notion de pool commun) qui déclenche, à son tour, avec le Ca^{2+} provenant des autres DHPR, l'ouverture des autres RyR (2, 3), rendant le système non modulable, ce qui ne correspond pas à la réalité expérimentale. **B :** dans la nouvelle théorie dite du « contrôle local », quelques RyR sont activés par les quelques DHPR qui leur sont directement associés; l'augmentation du signal calcique est lié au recrutement d'un plus grand nombre de DHPR et donc de RyR. **C :** dans l'hypertrophie du myocyte cardiaque, il semble exister, dès les premiers stades, un « découplage » entre les DHPR et les RyR, rendant l'activation locale de ceux-ci plus laborieuse, malgré un courant calcique dont la densité est conservée. Les distances entre le tubule t et le réticulum sarcoplasmique ne sont pas le reflet d'analyses histologiques mais la représentation de modèles.

résultats, une première série d'expériences menée sur les myocytes des rats sans insuffisance cardiaque montre un signal calcique d'amplitude fortement diminuée par rapport au signal témoin, sans modification de la densité

du courant calcique entrant, situant la ou les anomalies responsables de la diminution du signal en aval de ce courant (figure 1B). Cependant, la localisation des étincelles calciques au niveau des tubules-t, ainsi que leurs para-

mètres d'amplitude, de largeur et de cinétique sont identiques dans les deux groupes. De même, le contenu calcique du réticulum sarcoplasmique et la liaison de la ryanodine à des vésicules de réticulum sarcoplasmique purifiées et incorporées dans des bicouches lipidiques sont inchangées; l'ensemble de ces données suggère donc fortement que les anomalies responsables de la diminution du signal calcique des myocytes hypertrophiés se situent en amont des RyR, au niveau de la transmission du signal entre les DHPR et les RyR. C'est pourquoi Gomez *et al.* [1] ont cherché à avoir une idée plus précise de la capacité du courant calcique de déclencher, sur une période de temps donnée, le relargage du calcium par le réticulum sarcoplasmique en mesurant le nombre d'étincelles calciques et en intégrant le courant calcique entrant pendant la durée de la dépolarisation membranaire. Les résultats indiquent que la

sensibilité des RyR au Ca^{2+} est normale et montrent clairement que la capacité de l'influx local de Ca^{2+} lié à l'ouverture des DHPR d'activer les RyR et de déclencher ainsi les étincelles calciques est diminuée dans les myocytes hypertrophiés. Une modélisation mathématique basée sur les lois de la diffusion et prenant en compte la distance entre les DHPR et les RyR (environ 15×10^{-9} m) confirme l'hypothèse selon laquelle l'ensemble des résultats de l'étude peut parfaitement s'expliquer par l'existence de modifications architecturales de la diade et en particulier par une augmentation de la distance qui sépare les DHPR des RyR (figure 2C). Ces altérations sont totalement corrigées par l'exposition des cellules à un agoniste des récepteurs β -adrénergiques, l'isoprotérénol, suggérant la possibilité, *in vivo*, d'un rôle compensateur d'une augmentation du tonus sympathique à ce stade. Cette correction pourrait être liée à l'augmentation du courant ICa qui fait suite à la phosphorylation du canal par une PKA, à l'augmentation de la charge en calcium du réticulum sarcoplasmique à la suite de l'augmentation de l'activité de SERCA consécutive à la phosphorylation du phospholamban, dépendante de la PKA, ou encore à des modifications au niveau du RyR qui restent à préciser. Les expériences réalisées sur les myocytes des rats en insuffisance cardiaque révèlent un courant calcique de densité également normale et des anomalies du couplage excitation-contraction en tous points semblables à celles observés chez les rats dépourvus d'insuffisance cardiaque. En revanche, l'isoprotérénol est sans effet, indiquant l'incapacité de la stimulation des récepteurs β -adrénergiques (dont la densité et la fonction de transmission sont diminuées) à compenser les altérations du couplage excitation-contraction au stade de l'insuffisance cardiaque et soulignant, une fois de plus, le caractère multifactoriel du processus physiopathologique qui y conduit.

Remodelage de la micro-architecture du myocyte

Il serait sans doute exagéré de dire que l'article de Gomez *et al.* remet

complètement en cause notre conception de la physiopathologie moléculaire et cellulaire de l'insuffisance cardiaque. Ils en confirment, en effet, certains aspects comme la notion de continuité des modifications entre le stade de l'hypertrophie compensée et celui de l'insuffisance cardiaque. Au-delà de cette continuité, il est d'ailleurs surprenant d'observer l'importance des altérations du couplage excitation-contraction chez des animaux sans insuffisance cardiaque dont les ventricules et les myocytes ne présentent qu'une hypertrophie somme toute modeste. C'est là un élément de plus démontrant que le remodelage du myocyte cardiaque débute de façon très précoce quand le cœur est soumis à des conditions inhabituelles de fonctionnement. Comme indiqué ci-dessus, le travail de Gomez *et al.* confirme aussi le rôle très important du tonus sympathique pour maintenir un fonctionnement cardiaque normal face à des modifications phénotypiques et fonctionnelles qui s'établissent dès les toutes premières phases des cardiopathies. En revanche, les résultats de Gomez *et al.* doivent sans aucun doute nous conduire au réexamen attentif de nos conceptions sur le dysfonctionnement du réticulum sarcoplasmique dans les cardiopathies. Clairement, la diminution des capacités de recaptage du Ca^{2+} par le réticulum sarcoplasmique, que cette diminution soit liée ou non à une sous-expression de SERCA, en tant que principal mécanisme physiopathologique de l'insuffisance cardiaque semble avoir vécu, au moins dans certains modèles expérimentaux et/ou stades de la maladie. Dans le cas particulier des rats insuffisants cardiaques de l'étude de Gomez *et al.*, la synthèse protéique de SERCA serait normale bien que cela ne préjuge pas des capacités de recaptage calcique du réticulum sarcoplasmique. Il existe donc probablement, dès le stade d'hypertrophie compensée et dans au moins un modèle d'insuffisance cardiaque, un remodelage de la micro-architecture cellulaire qui entraîne, au niveau des diades, un découplage entre les DHPR et les RyR. En tous cas, il n'existe actuellement pas d'autre

explication aux résultats publiés par Gomez *et al.* Ces résultats obtenus dans une espèce mammifère où le réticulum sarcoplasmique joue un rôle particulièrement important dans le couplage excitation-contraction, appellent néanmoins de nouvelles études dans d'autres espèces qui viendront confirmer et préciser les modalités de ce découplage. Mais c'est finalement la principale nouveauté de l'article de Gomez *et al.* que de mettre en avant, dans le processus physiopathologique éminemment complexe et multifactoriel de l'insuffisance cardiaque, la possibilité d'un remodelage de l'architecture du myocyte à côté du remodelage lié aux modifications qualitatives et quantitatives de l'expression de gènes impliqués dans sa fonction. A bon « thérapeute génique » salut ! ■

Jean-Jacques Mercadier

Directeur de recherche au Cnrs

Stéphane Hatem

Chargé de recherche à l'Inserm

Inserm U. 460, Faculté Xavier-Bichat, 16, rue Henri-Huchard, 75018 Paris, France.

TIRÉS À PART

J.J. Mercadier.

RÉFÉRENCES

1. Gomez AM, Valdivia HH, Cheng H, Lederer MR, Santana LF, Cannell MB, McCune SA, Altschuld RA, Lederer WJ. Defective excitation-contraction coupling in experimental cardiac hypertrophy and heart failure. *Science* 1997; 276: 800-6.
2. Capiod T, Méry P, Pacaud P, Takeda K. Des portes s'ouvrent sur les allées et venues des ions calcium. *Med Sci* 1995; 11: 1027-33.
3. Cleemann L, Morad M. Role of Ca^{2+} channel in cardiac excitation-contraction coupling in the rat: evidence from Ca^{2+} -transients and contraction. *J Physiol* 1991; 432: 283-312.
4. Fabiato A. Time and calcium dependence of activation and inactivation of calcium-induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of a skinned cardiac purkinje cell. *J Gen Physiol* 1985; 85: 247-89.
5. Stern MD. Theory of excitation-contraction coupling in cardiac muscle. *Biophys J* 1992; 63: 497-517.

RÉFÉRENCES

6. 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.
7. Cannell MB, Cheng H, Lederer WJ. The control of calcium release in heart muscle. *Science* 1995; 268: 1045-9.
8. Gwathmey JK, Morgan JP. Altered calcium handling in experimental pressure-overload hypertrophy in the ferret. *Circ Res* 1985; 57: 836-43.
9. Beuckelmann DJ, Näbauer M, Erdmann E. Intracellular calcium handling in isolated ventricular myocytes from patients with terminal heart failure. *Circulation* 1992; 85: 1046-55.
10. Hatem SN, Sham JSK, Morad M. Na-Ca exchange activity is enhanced in cardiomyopathic Syrian hamster. *Circ Res* 1994; 74: 253-61.
11. Ito Y, Suko J, Chidsey CA. Intracellular calcium and myocardial contractility: calcium uptake of sarcoplasmic reticulum fractions in hypertrophied and failing rabbit hearts. *J Mol Cell Cardiol* 1974; 6: 237-42.
12. De la Bastie D, Levitsky D, Rappaport L, Mercadier JJ, Marotte F, Wisniewsky C, Brovkovich V, Schwartz K, Lompré AM. Function of the sarcoplasmic reticulum and expression of its Ca²⁺-ATPase gene in pressure overload-induced cardiac hypertrophy in the rat. *Circ Res* 1990; 66: 554-64.
13. Mercadier JJ, Lompré AM, Duc P, Boheler KR, Fraysse JB, Wisniewsky C, Allen PD, Komajda M, Schwartz K. Altered sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase gene expression in the human ventricle during end-stage heart failure. *J Clin Invest* 1990; 85: 305-9.
14. Rannou F, Sainte-Beuve C, Oliviero P, Do E, Trouvé P, Charlemagne D. The effects of compensated cardiac hypertrophy on dihydropyridine and ryanodine receptors in rat, ferret and guinea-pig hearts. *J Mol Cell Cardiol* 1995; 27: 1225-34.
15. Go LO, Moschella MC, Watras J, Handa KK, Fyfe BS, Marks AR. Differential regulation of two types of intracellular calcium release channels during end-stage heart failure. *J Clin Invest* 1995; 95: 888-94.

■■■ BRÈVES ■■■

■■■ Le métabolisme de la vitamine D astucieusement éclairé.

L'homéostasie calcique et la croissance osseuse sont sous la dépendance étroite de la vitamine D. Parce qu'elle participe à l'étape ultime de l'activation de la vitamine D, la 25-hydroxyvitamine D₃ 1 α -hydroxylase [1 α (OH)ase] joue un rôle crucial dans l'organisme. Dans le tubule proximal rénal, lieu de sa synthèse, cette enzyme est présente en quantité limitée; le gène codant pour cette enzyme est inhibé par son substrat, la vitamine D active liée à son récepteur nucléaire. Contournant cet obstacle, une équipe japonaise a réalisé le clonage de l'ADNc de l'enzyme en utilisant un modèle de souris transgéniques dépourvues du récepteur VDR (VDR pour *vitamin D receptor*) [1]. Chez les animaux VDR^{-/-} de 7 semaines avait été enregistrée une forte concentration de vitamine D sérique, conséquence probable de l'activité importante de la 1 α (OH)ase; le gène codant pour

l'enzyme n'étant plus sous le contrôle négatif de la vitamine D était sans doute surexprimé. L'ADNc de l'enzyme a été cloné par une stratégie d'expression dans les cellules COS 1 transfectées avec une banque d'ADNc de rein de souris VDR^{-/-}. Un clone a été isolé codant pour une protéine de 507 acides aminés (55 kDa) qui comporte un signal de ciblage à la mitochondrie et présente une forte analogie avec les membres de la famille des enzymes P450, caractérisés par un domaine de liaison des stéroïdes et un domaine de liaison de l'hème très conservés. Alors qu'un transcrite est détecté uniquement dans le rein des souris VDR^{+/-} et VDR^{-/-}, chez ces dernières, il est toujours plus abondant (2,5 fois plus à 3 semaines, et 50 fois plus à 7 semaines). Phénomène attendu et confirmé, les souris VDR^{-/-} traitées par la vitamine D voient l'expression du gène de 1 α (OH)ase fortement réprimée, ce qui n'est pas le cas des souris VDR^{-/-}. Ces résultats apportent la

démonstration définitive que l'expression de la 1 α (OH)ase, en conditions physiologiques, est totalement sous le contrôle négatif du récepteur VDR activé par son ligand, la vitamine D. A l'inverse, une autre enzyme participant à la synthèse de vitamine D active, la 24(OH)ase, qui convertit le 25(OH)D₃ en 24R25(OH)₂D₃, est absente chez les souris VDR^{-/-}, et on peut penser que son gène est, quant à lui, activé par le récepteur VDR et l'hormone. La synthèse de vitamine D active fait donc appel à des mécanismes de régulation complexes encore mal connus, que les résultats récents contribueront à élucider. Déjà, chez l'homme, certains cas de rachitisme sont attribués à la probable mutation du gène codant pour la 1 α (OH)ase. La confirmation d'un tel phénomène ne tardera sans doute pas à venir !

[1. Takeyama KI, *et al. Science* 1997; 277: 1827-30.]

Symposium international Strategies in virus-host relationships Lyon, France 16-18 février 1998 organisé par la Fondation Mérieux

Informations-inscriptions : Betty Dodet, Fondation Mérieux, 17, rue Bourgelat, 69002 Lyon, France
Tél. : 04 72 73 78 44 - Fax : 04 72 73 79 93
e-mail: 100765.1401@compuserve.com web: www.fond-merieux.org