



HAL
open science

Contrôle β -adrénergique du courant calcique de type L cardiaque : Le chaînon manquant enfin découvert

Jérôme Leroy, Rodolphe Fischmeister

► To cite this version:

Jérôme Leroy, Rodolphe Fischmeister. Contrôle β -adrénergique du courant calcique de type L cardiaque : Le chaînon manquant enfin découvert. Médecine/Sciences, 2020, 36 (6-7), pp.569-572. 10.1051/medsci/2020104 . hal-02890194

HAL Id: hal-02890194

<https://hal.science/hal-02890194>

Submitted on 6 Jul 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Contrôle β -adrénergique du courant calcique de type L cardiaque : le chaînon manquant enfin découvert

Jérôme Leroy, Rodolphe Fischmeister

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

jerome.leroy@universite-paris-saclay.fr

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

L'effet stimulateur des catécholamines sur $I_{Ca,L}$ est dû à l'augmentation de la durée d'ouverture du canal $Ca_v1.2$ véhiculant ce courant calcique et à un déplacement des conditions de son activation et de son inactivation vers des valeurs plus négatives du potentiel de membrane. Cela se traduit par une augmentation de 2 à 3 fois de l'amplitude du courant. Les catécholamines, en se fixant aux récepteurs β -adrénergiques (β -AR), activent, par l'intermédiaire d'une protéine Gas, les adénylate cyclases qui synthétisent l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc), dont la cible principale est la protéine kinase dépendante de l'AMPc (PKA) (**Figure 1**). Bien que la possibilité d'une stimulation directe des canaux calciques par les protéines Gas ait d'abord été envisagée, il a été clairement établi, il y aura bientôt 30 ans, que cette stimulation implique une

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

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

phosphorylation par la PKA, qui augmente $I_{Ca,L}$ [2]. Depuis lors, l'hypothèse d'une phosphorylation directe du canal Cav1.2 a été explorée par de nombreux chercheurs qui se sont évertués à déterminer quels motifs de ce canal étaient les cibles de la PKA.

Cav1.2 est une protéine multimérique, dont la sous-unité principale, α_{1C} , constitue le pore du canal. Cette protéine de 240 kDa est constituée de quatre domaines hydrophobes de six segments transmembranaires souhaiterai garder aires chacun, qui confèrent au canal ses propriétés biophysiques et pharmacologiques. La sous-unité principale α_{1C} est associée à des protéines auxiliaires dont l'une, $\alpha_2\text{-}\delta$, est largement extracellulaire, et une autre, Cav β 2, intracellulaire, se fixe à la boucle intracellulaire située entre les domaines I et II d' α_{1C} (**Figure 1**). Ces sous-unités auxiliaires sont impliquées dans l'expression du canal Cav1.2 à la membrane plasmique et influencent ses propriétés biophysiques. En particulier, Cav β 2 est impliquée dans la probabilité d'ouverture du canal et la dépendance de son activation et de son inactivation vis-à-vis du potentiel électrique [3].

Les sous-unités α_{1C} et Cav β 2 de Cav1.2 présentent de nombreux sites potentiels de phosphorylation par PKA (**Figure 1**). Le rôle d'une phosphorylation de Cav β 2 sur trois de ses résidus sérine avait été proposé puis démenti, puisque la suppression de ces sites par *knock-in* chez la souris ne prévient pas la modulation d' $I_{Ca,L}$ par PKA [4]. Le résidu Ser₁₉₂₈, situé dans la partie C-terminale d' α_{1C} , est phosphorylé par PKA lors d'une stimulation de β -AR, et a longtemps été considéré comme le résidu indispensable au contrôle β -adrénergique du canal. Néanmoins, comme pour Cav β 2, son importance a été contestée. Le rôle critique de la partie C-terminale d' α_{1C} avait cependant été réaffirmé par l'identification du résidu Ser₁₇₀₀ comme celui qui, lorsqu'il est phosphorylé par la PKA, conduisait à l'augmentation d' $I_{Ca,L}$ [5] ; mais là encore, son rôle a ensuite été démenti [6]. Dans leur étude, Liu *et al.* réfutent définitivement la responsabilité d'une phosphorylation directe des sous-unités du canal Cav1.2 dans sa régulation β -adrénergique. En effet, après avoir remplacé, par mutagenèse dirigée, les 88 résidus sérine et thréonine des sous-unités α_{1C} et Cav β 2, cibles potentielles de PKA, par un résidu alanine (non phosphorylable), ils montrent que le canal muté exprimé dans le cœur de souris répond tout à fait normalement à une stimulation β -adrénergique ou à une élévation de la

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

Liu *et al.* ont utilisé une approche originale de protéomique pour rechercher le chaînon manquant à cette modulation du canal. Pour trouver ce partenaire, ils ont associé à Cav1.2 une enzyme permettant la biotinylation de l'ensemble des protéines se trouvant dans un périmètre d'environ 20 nm. Les protéines ainsi étiquetées ont ensuite été identifiées par spectrométrie de masse. Parmi les centaines de protéines ainsi marquées, l'une d'elles, la protéine Rad (*Ras associated with diabetes*), est enrichie dans l'environnement du canal en conditions basales, et sa présence est fortement réduite lorsque les échantillons ont été soumis à une stimulation β -adrénergique. Rad est une GTPase connue pour inhiber Cav1.2 par son interaction avec Cav β 2 (*Au : OK ?*) [7]. Cette petite protéine G monomérique, très abondante dans le cœur, avait été identifiée comme un inhibiteur endogène d' $I_{Ca,L}$. En effet, la surexpression du gène codant Rad atténue la stimulation β -AR du couplage excitation-contraction en diminuant les effets de l'isoprénaline sur l'amplitude d' $I_{Ca,L}$, des transitoires calciques et de la contraction mesurés sur cardiomyocytes isolés (*? Au : Merci de clarifier...*) [8], tandis que son invalidation augmente $I_{Ca,L}$ en lui conférant un phénotype similaire à celui du courant stimulé par PKA [9]. De plus, des sites de phosphorylation de Rad par PKA étaient connus [10]. Un candidat qui semble *a posteriori* parfait.

Les pièces d'un puzzle déjà présentes dans la littérature ont ainsi été assemblées par Liu *et al.*, qui remettent au centre de cette régulation la sous unité Cav β 2 et l'interaction avec le canal d'une petite protéine G. Utilisant la technique de transfert d'énergie entre protéines fluorescentes (*fluorescence resonance energy transfer*, FRET), les auteurs démontrent que la phosphorylation de Rad par PKA inhibe son interaction à Cav β 2, ce que confirme la substitution de quatre résidus sérine de Rad, cibles de PKA, par des résidus alanine, qui prévient leur dissociation. De plus, ces mutations empêchent la levée d'inhibition de l'activité de Cav1.2. Les auteurs précisent que deux de ces résidus sérine, situés dans la partie C-terminale de la protéine, sont indispensables non seulement aux effets inhibiteurs de Rad sur $I_{Ca,L}$, mais aussi pour sa dissociation de la membrane, où elle s'associerait avec les phospholipides chargés négativement comme

le phosphatidylinositol-4,5-biphosphate (PIP₂). Ainsi, d'après ces travaux, en l'absence d'une stimulation β -adrénergique, Rad, ancrée à la membrane plasmique par sa partie C-terminale, séquestrerait la sous-unité Cav β 2 du canal Cav1.2. Les catécholamines, en activant la voie AMPc/PKA, permettraient la phosphorylation de Rad, sa dissociation de la membrane plasmique, et libèreraient Cav β 2, qui pourrait ainsi augmenter l'activité du canal pour promouvoir l'entrée de calcium dans le cardiomyocyte et contribuer à l'effet inotrope positif de la stimulation β -adrénergique (**Figure 2**).

Plus de 50 ans après la découverte de l'augmentation de $I_{Ca,L}$ par l'adrénaline [11, 12], il semble donc que Liu *et al.* ont enfin élucidé le mystère du mécanisme moléculaire de cet effet en identifiant la petite protéine G Rad comme le chaînon manquant dans la régulation de Cav1.2 par la PKA. Certes, les travaux de cette équipe de chercheurs, dirigée par S.O. Marx, ont été réalisés en surexprimant Cav1.2 dans des systèmes hétérologues, ou en introduisant un canal exogène dans le contexte plus physiologique du cardiomyocyte, et ces approches expérimentales sont critiquables. On peut néanmoins raisonnablement espérer que l'analyse de souris « *knock-in* » chez lesquelles les sites de phosphorylation de Rad par PKA auront été mutés validera le modèle suggéré par les résultats de cette remarquable étude.

Bien qu'elle semble clore un chapitre important de la recherche concernant le mécanisme du contrôle β -adrénergique d' $I_{Ca,L}$, cette étude ouvre également de nouveaux champs d'exploration. Nous pouvons par exemple nous demander quels rôles jouent le GTP et l'activité GTPase de Rad dans cette régulation d' $I_{Ca,L}$, et plus largement dans la signalisation par β -AR ? La question du rôle de l'interaction entre Rad et Cav β 2 dans le trafic et l'expression fonctionnelle de Cav1.2 à la membrane est posée. Qu'en est-il de cette régulation du fonctionnement des canaux calciques par Rad dans d'autres tissus comme les vaisseaux ? L'interaction de Rad avec Cav1.2 modifie-t-elle ses propriétés pharmacologiques ? Il y a peu d'études concernant le rôle de Rad en conditions pathologiques, mais il semble que son expression est diminuée dans le cœur des patients insuffisants cardiaques à fraction d'éjection ³ réduite [13]. Qu'en est-il dans d'autres

³ La *fraction d'éjection* est le pourcentage d'éjection du sang contenu dans une cavité cardiaque lors d'un battement. En l'absence de précision, elle désigne généralement la fraction d'éjection du ventricule

maladies cardiaques, comme la fibrillation atriale? Peut-on espérer, en ciblant Rad ou son interaction avec Cav1.2, obtenir un effet inotrope positif ou à l'inverse, inhiber une entrée de calcium pro-arythmique ou qui contribue au remodelage cardiaque pathologique ? Peut-on espérer traiter de manière plus spécifique certaines formes d'insuffisance cardiaque en ciblant Rad plutôt qu'en utilisant des médicaments β -bloquants ?

Titre en anglais

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

gauche, qui est un reflet de la bonne fonction contractile de cette partie du [cœur](#) la plus importante pour son rôle de pompe.

Références

1. Liu G, Papa A, Katchman AN, *et al.* Mechanism of adrenergic Ca_v1.2 stimulation revealed by proximity proteomics. *Nature* 2020 ; 577 : 695-700.
2. Hartzell HC, Méry P-F, Fischmeister R, *et al.* Sympathetic regulation of cardiac calcium current is due exclusively to cAMP-dependent phosphorylation. *Nature* 1991 ; 351 : 573-6.
3. Hofmann F, Flockerzi V, Kahl S, *et al.* L-type Ca_v1.2 calcium channels: from *in vitro* findings to *in vivo* function. *Physiol Rev* 2014 ; 94 : 303-26.
4. Brandmayr J, Poomvanicha M, Domes K, *et al.* Deletion of the C-terminal phosphorylation sites in the cardiac β -subunit does not affect the basic β -adrenergic response of the heart and the Cav1.2 channel. *J Biol Chem* 2012 ; 287 : 22584-92.
5. Fuller MD, Emrick MA, Sadilek M, *et al.* Molecular mechanism of calcium channel regulation in the fight-or-flight response. *Sci Signal* 2010 ; 3 : ra70.
6. Yang L, Katchman A, Samad T, *et al.* β -adrenergic regulation of the L-type Ca²⁺ channel does not require phosphorylation of α 1C Ser₁₇₀₀. *Circ Res* 2013 ; 113 : 871-80.
7. Finlin BS, Crump SM, Satin J, *et al.* Regulation of voltage-gated calcium channel activity by the Rem and Rad GTPases. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003 ; 100 : 14469-74.
8. Wang G, Zhu X, Xie W, *et al.* Rad as a novel regulator of excitation-contraction coupling and β -adrenergic signaling in heart. *Circ Res* 2010 ; 106 : 317-27.
9. Ahern BM, Levitan BM, Veeranki S, *et al.* Myocardial-restricted ablation of the GTPase RAD results in a pro-adaptive heart response in mice. *J Biol Chem* 2019 ; 294 : 10913-27.
10. Moyers JS, Zhu J, Kahn CR. Effects of phosphorylation on function of the Rad GTPase. *Biochem J* 1998 ; 333 : 609-14.
11. Reuter H. The dependence of the slow inward current on external calcium concentration in Purkinje fibres. *J Physiol* 1967 ; 192 : 479-92.
12. Vassort G, Rougier O, Garnier D, *et al.* Effects of adrenaline on membrane inward currents during the cardiac action potential. *Pflügers Arch* 1969 ; 309 : 70-81.
13. Levitan BM, Manning JR, Withers CN, *et al.* Rad-deletion phenocopies tonic sympathetic stimulation of the heart. *J Cardiovasc Transl Res* 2016 ; 9 : 432-44.

Légendes des figures

Figure 1 : Représentation schématique de la structure du canal calcique cardiaque Cav1.2 et de ses sous-unités auxiliaires (Cav β 2 et α 2- δ), et de sa régulation β -adrénergique.

Dans le cardiomyocyte, la stimulation des récepteurs β -adrénergiques (β -AR) par la noradrénaline (NAdr) et l'adrénaline (Adr) active, par l'intermédiaire d'une protéine Gas, l'adénylate cyclase qui, à partir d'ATP, synthétise l'adénosine monophosphate cyclique (AMPC), dont la cible principale est la protéine kinase dépendante de l'AMPC (PKA). Il avait été proposé que cette kinase phosphorylait la partie C-terminale de la sous-unité principale α_{1C} ou la sous-unité Cav β 2 du canal calcique Cav1.2. En mutant tous les sites cibles potentiels de la phosphorylation par PKA, Liu *et al.* démontrent que la phosphorylation directe de Cav1.2 n'est pas requise pour augmenter l'amplitude du courant $I_{Ca,L}$ lors de l'activation des β -AR. La partie basse de la figure montre une trace de courant (*Au : OK ?*) $I_{Ca,L}$ d'un cardiomyocyte de souris (*Au : OK ?*), obtenue par la technique de *patch-clamp*, en l'absence (en noir) ou en présence (en rouge) d'isoprénaline.

Figure 2 : Régulation β -adrénergique de Cav1.2 impliquant Rad

Dans le modèle que proposent Liu *et al.*, la petite protéine G Rad est la cible de la PKA qui contrôle l'activité de Cav1.2. En l'absence de stimulation β -adrénergique, Rad est ancrée à la membrane plasmique par sa partie C-terminale, et se fixe à la sous-unité Cav β 2 du canal pour inhiber son activité. Lorsque la PKA est activée, elle phosphoryle Rad, ce qui la dissocie de la membrane plasmique et libère Cav β 2, qui peut ainsi augmenter l'activité du canal pour promouvoir l'entrée de calcium dans le cardiomyocyte.

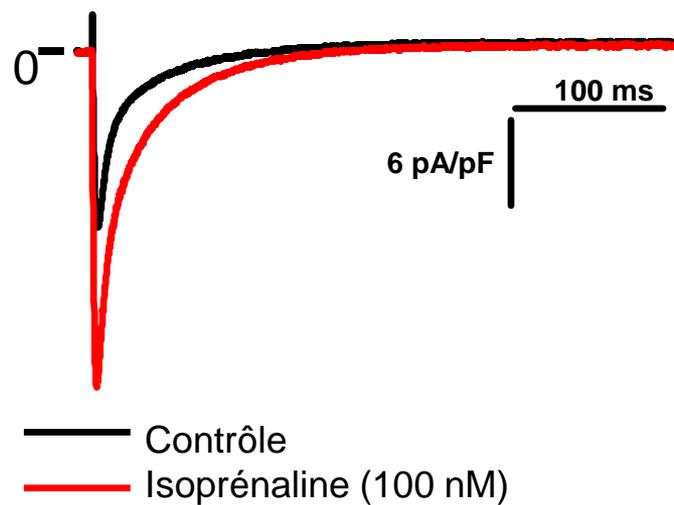
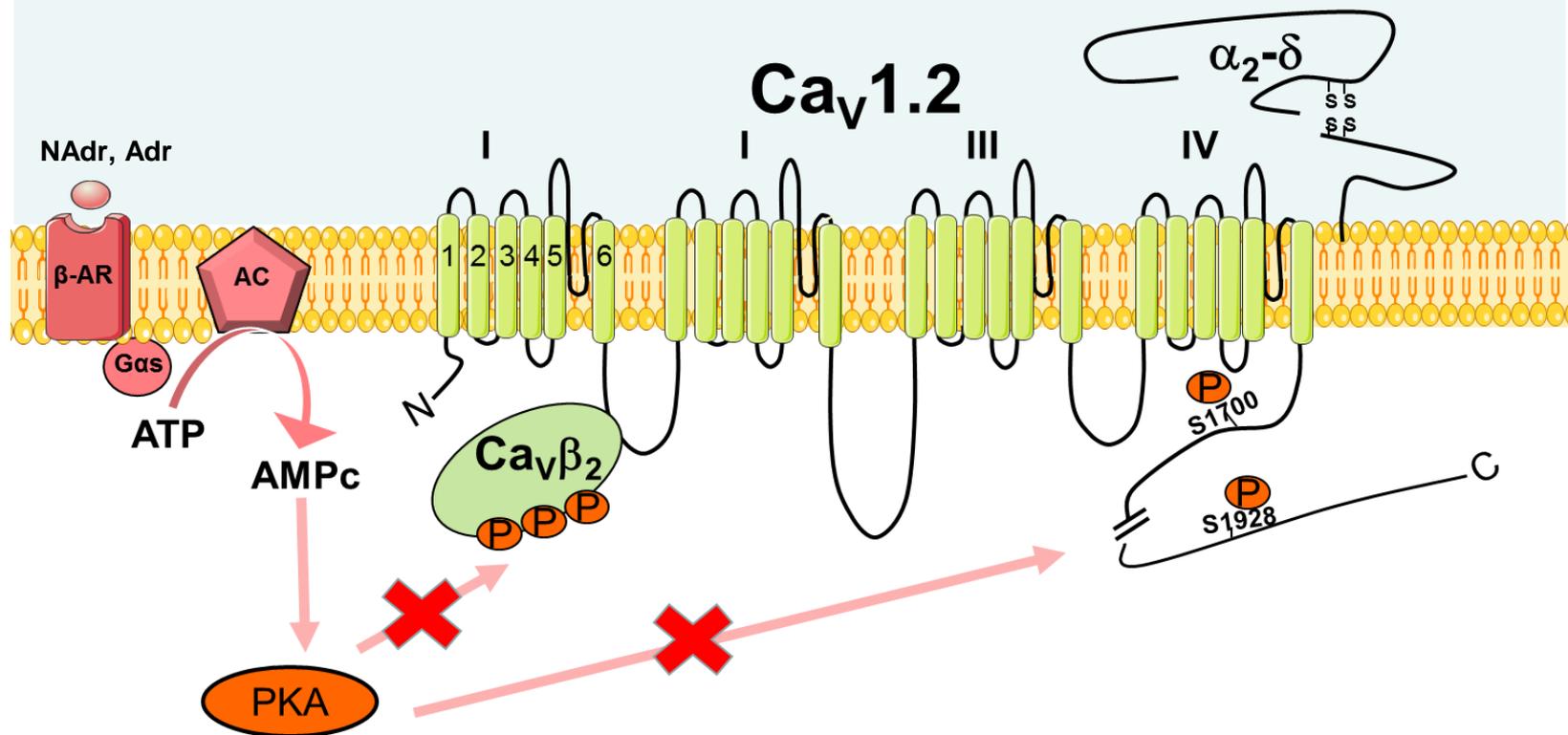
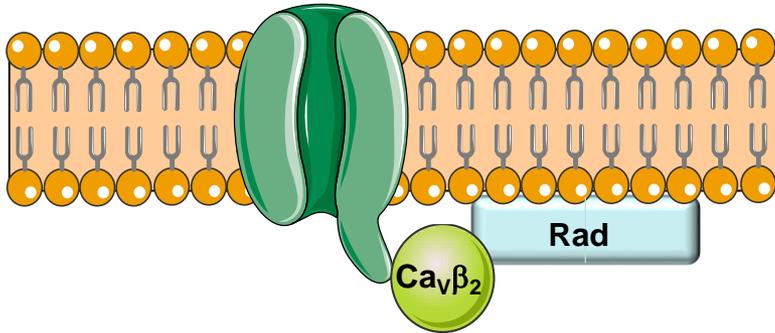


Figure 1

A

Activité de $Ca_v1.2$ partiellement inhibée



B

Augmentation de l'activité de $Ca_v1.2$

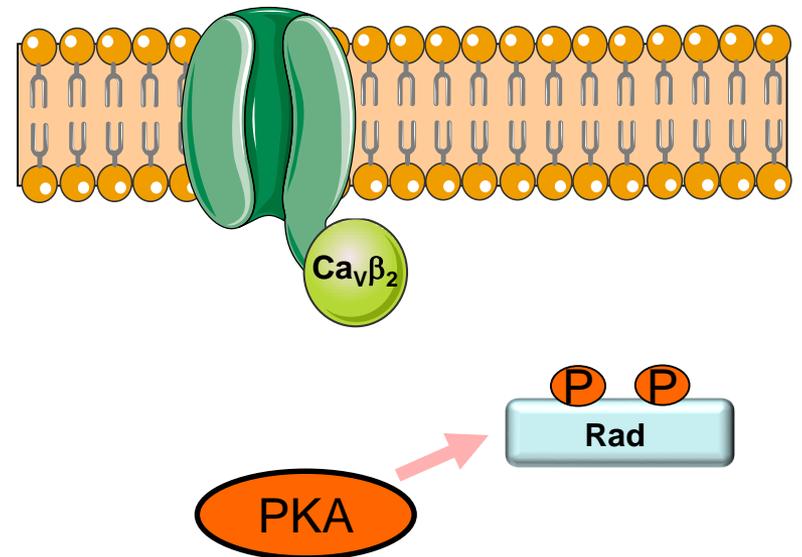


Figure 2