

La suppression de FKBP12 modifie l'activité du canal calcique du réticulum sarcoplasmique et induit une cardiopathie dilatée

La contraction du muscle cardiaque est déclenchée par l'augmentation brutale de la concentration en calcium libre intracytosolique ($[Ca^{2+}]_i$) obtenue par le flux entrant de Ca^{2+} externe et le relargage du Ca^{2+} du réticulum sarcoplasmique. Très schématiquement, la dépolarisation membranaire active le canal calcium de type L (récepteur des dihydropyridines ou DHPR) et l'augmentation de $[Ca^{2+}]_i$ provoque l'activation du canal calcique du réticulum sarcoplasmique (également appelé récepteur de la ryanodine ou RyR) et le relargage du calcium stocké dans le réticulum sarcoplasmique au cours de la relaxation (figure 1A). Le calcium ainsi libéré se fixe sur les myofibrilles. Alexandre Fabiato [1] a été l'un des premiers à proposer ce concept de la libération autocatalytique du calcium du réticulum sarcoplasmique par l'influx rapide de calcium dans le cardiomyocyte, en opposition au mécanisme proposé pour le muscle squelettique dans lequel la dépolarisation membranaire et le mouvement de charges du détecteur de potentiel du canal calcique de type L sont suffisants pour activer directement le canal calcique du réticulum sarcoplasmique [2, 3]. Sans entrer dans le détail des isoformes exprimées et des conséquences physiologiques de cette expression, des expériences de mutagenèse dirigée, de délétions et de transfections ont souligné que le type de couplage (cardiaque ou squelettique) dépendait non seulement du type cardiaque ou squelettique des isoformes de la sous-unité $\alpha 1$ du canal calcique L [3] et du récepteur de la ryanodine (RyR1 du muscle squelettique et RyR2 du muscle car-

diaque) [4], mais également de sous-unités régulatrices associées à ces deux principaux acteurs [5]. Le très grand mérite du récent article de Shou *et al.* (Houston, TX, USA) est d'avoir démontré *in vivo* le rôle pré-

pondérant de l'une de ces protéines régulatrices, FKBP12, dont l'absence modifie l'activité du canal RyR2, conduisant au développement d'une cardiopathie de type dilatée chez des souris déficientes en FKBP12 [6].

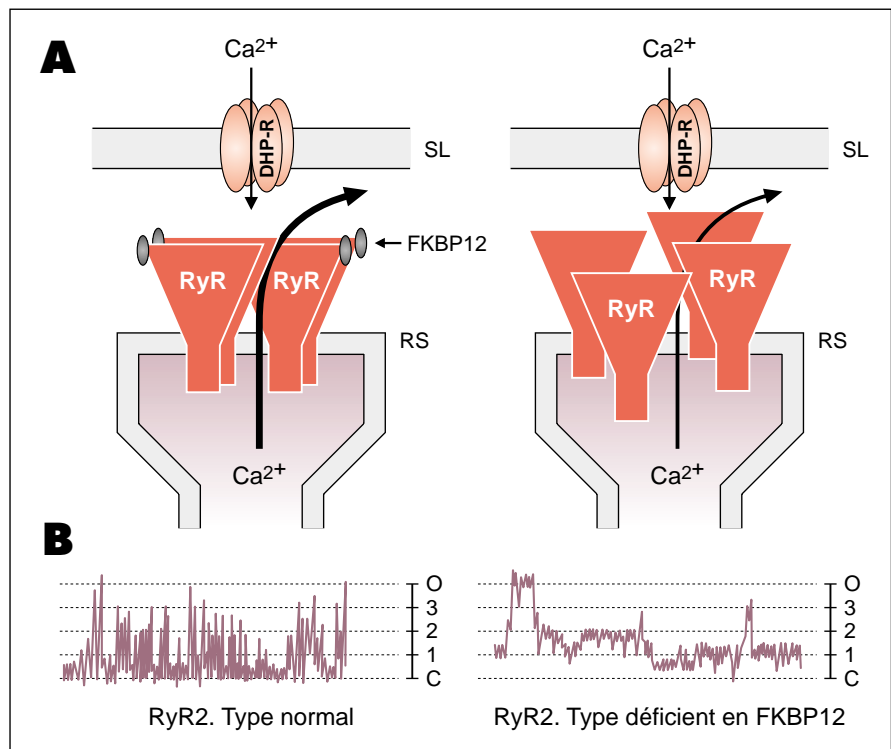


Figure 1. **Rôle possible de FKBP12 sur l'organisation (A) et l'activité (B) du canal calcique du réticulum sarcoplasmique dans le couplage excitation-contraction.** A. En présence de FKBP12, le tétramère de RyR serait stabilisé, conférant une activité maximum au canal avec un état de conductance maximum (O) et un temps d'ouverture prolongé. En l'absence de FKBP12, l'organisation du tétramère deviendrait plus instable et l'activité du canal varierait : états intermédiaires de conductance (1, 2, 3) et temps d'ouverture réduits (adapté de [5]). B. Analyse par voltage-clamp de l'activité du canal RyR2 de souris de type normal ou déficientes en FKBP12. L'activité est mesurée après reconstitution dans des bicouches lipidiques [6]. SL : sarcolemme ; RS : réticulum sarcoplasmique ; RyR : récepteur de la ryanodine (canal calcique du réticulum).

Acteurs du couplage excitation-contraction

Pour bien comprendre la portée de cet article, il faut revenir brièvement sur les propriétés des isoformes squelettique et cardiaque RyR1 et RyR2. Ces deux isoformes sont codées par des gènes différents, exprimant des récepteurs d'environ 560 kDa qui présentent 66 % d'identité; ces récepteurs présentent un domaine cytoplasmique (80 % de la protéine) qui constitue la structure « pied » de la protéine, et une partie carboxy-terminale transmembranaire qui représente 20 % de la protéine (*figure 1A*). Dans les membranes du réticulum sarcoplasmique, ces récepteurs forment un tétramère dont l'activité de canal calcique a pu être mesurée par la technique du *voltage-clamp* après reconstitution dans des bicouches lipidiques. Différents états de conductance ont été observés (*figure 1B*): l'état ouvert (O) et 3 sous-états, correspondant à des amplitudes de 3/4, 1/2 et 1/4 de l'état ouvert. Des mutations obtenues par recombinaison homologue au locus de RyR1 (souris mutantes *skrr^{m1}/skrr^{m1}*) provoquent des anomalies sévères et attendues du couplage excitation-contraction du muscle squelettique, conduisant à la mort du nouveau-né et démontrant que l'isoforme cardiaque, présente, ne peut remplacer l'isoforme squelettique [7]. Dans les myotubes de ces souris mutantes, la transfection et l'expression de RyR2 conduisent à un couplage excitation-contraction de type cardiaque et celles de RyR1 restaurent un couplage excitation-contraction de type squelettique [4]. On pouvait alors penser que les protéines régulatrices n'avaient qu'un rôle secondaire, mais l'article de Shou *et al.* [6] sur les souris déficientes en FKBP12 démontre qu'il n'en est rien et renforce le concept de la différence entre les deux types cardiaque et squelettique du couplage excitation-contraction.

FK506-binding proteins

FKBP12 et FKBP12,6 sont des protéines de la famille des immunophilines qui lient des facteurs immunosuppresseurs tels que FK506 et

rapamycine. Ce sont des enzymes de type proline-isomérase de 12 et 12,6 kDa. Leur interaction avec des protéines comme TGF- β 1/activine laisse supposer un rôle dans la transmission de signaux (*m/s n° 11, vol. 10, p. 1180*). L'équipe d'Andrew Marks (New York, USA) [5] a montré que FKBP12 était associée à RyR1 alors que FKBP12,6 était copurifiée avec l'isoforme cardiaque RyR2. Des expériences de co-transfections et de mesures d'activités de RyR dans des bicouches lipidiques *in vitro* permettaient, en outre, de poser l'hypothèse selon laquelle ces protéines réglaient les états de conductance et la durée d'ouverture du canal en s'associant au tétramère formé par RyR1 ou RyR2 et en le stabilisant. Ainsi, FKBP12, associée mole à mole à RyR1, stabilise le canal dans son état de plus haute conductance et prolonge son temps d'ouverture [5].

Conséquences physiologiques de la suppression de FKBP12

Cependant, le rôle *in vivo* de ces protéines régulatrices n'avait jamais été démontré et les résultats spectaculaires obtenus sur les souris déficientes en FKBP12 soulignent l'importance de cette régulation dans l'organogenèse et la fonction du muscle cardiaque [6].

Brièvement, un mutant du gène *FKBP12* a été obtenu par suppression des exons 3 et 4 selon la technique classique de transfection d'un allèle muté dans des cellules ES. Par croisement de souris hétérozygotes, on obtient à la génération F2 24 % d'embryons homozygotes délétés en FKBP12 au jour 14,5 de gestation. Cette distribution mendélienne n'est plus observée après 18,5 jours de gestation. Ce chiffre décroît à 17 %, à la suite du décès prématuré de nombreux embryons; 7 animaux ont survécu quelques semaines et 1 seulement quelques mois, soulignant la sévérité de l'atteinte.

La cause apparente de ces décès est le développement d'une cardiopathie dilatée étendue aux quatre chambres cardiaques, affirmée sur des critères morphologiques (amincissement de la paroi des ventricules, profondes cavités intertrabéculaires,

myocarde manquant de densité et défauts graves au niveau du septum), et fonctionnels (augmentation des diamètres télédiastoliques et télésystoliques du ventricule gauche mesurés par échocardiographie, fréquence cardiaque diminuée...). L'embryon présente, en outre, un œdème généralisé et une teinte pâle, symptômes courants de cardiopathie dilatée. Cette déficience cardiaque s'accompagne parfois d'anomalies du cerveau et du foie et, à un stade plus précoce, d'un défaut de fermeture du tube neural. En revanche, et de manière un peu surprenante puisque c'est FKBP12 majoritairement squelettique et non FKBP12,6 cardiaque qui est éteint, la fonction du muscle squelettique n'est pas altérée, remettant en cause le rôle physiologique de FKBP12 dans la régulation de RyR1.

Conséquences de la suppression de FKBP12 sur l'activité de RyR

Chez l'embryon normal, le gène *FKBP12* est fortement exprimé dans le cœur alors que l'ARNm de *FKBP12.6*, décrit comme l'analogue cardiaque de *FKBP*, ne l'est que très faiblement. Cette expression expliquait l'effet majeur de l'extinction de *FKBP12* sur le cœur mais son mode d'action restait à déterminer.

Parmi les rôles connus des immunophilines, quel est celui impliqué dans le développement de cette cardiopathie dilatée? Des transfections dans des fibroblastes ont éliminé un rôle de FKBP12 dans une transmission de signaux relayés par TGF- β 1/activine. Ne restait que la possibilité d'une régulation du canal récepteur de la ryanodine. En fait, cette hypothèse est la bonne puisque Shou *et al.* montrent (*figure 1B*) que l'absence de FKBP12 chez les mutants homozygotes modifie l'état de conductance du canal RyR2 du muscle cardiaque (majoritairement l'état O dans le type normal) en favorisant des états de sous conductance (1, 2, 3) et en prolongeant les temps d'ouverture. De manière similaire, l'activité de RyR1 est modulée par FKBP12: chez les souris déficientes en FKBP12, la conductance du canal RyR1 est diminuée et prolongée. Ces données peu-

vent s'expliquer par la stabilisation des quatre sous-unités de RyR1 et RyR2 en présence de FKBP12 (figure 1A), hypothèse développée dans le groupe d'Andrew Marks et démontrée *in vitro* par la coexpression de RyR1 et de FKBP12 dans des cellules d'insectes où FKBP12 modifie la coopérativité des sous-unités et prolonge la durée d'ouverture du canal tout en favorisant l'état de plus haute conductance [8]. L'hypothèse est séduisante par sa simplicité et sa cohérence mais, au vu des résultats de Shou *et al.*, ne semble pas rendre compte exactement de la situation telle qu'elle apparaît *in vivo* et les auteurs attribuent ces différences à l'utilisation fréquente de composés pharmacologiques (FK506, rapamycine ou caféine) dans ces expériences. Ce rôle de FKBP12 est également à rapprocher du développement de cardiopathies de type dilatées rapportées après transplantation d'un greffon provenant d'un enfant puis traitement par des facteurs immunosuppresseurs comme FK506 et la rapamycine. L'inhibition de FKBP12 par ces facteurs pourrait, comme l'absence de FKBP12 chez les souris déficientes, désorganiser le canal de relargage du calcium RyR2 et participer au développement de cette affection cardiaque. De manière surprenante, et bien que l'activité de RyR1 soit modifiée de manière similaire à celle de RyR2, aucune atteinte de la fonction du muscle squelettique n'est observée. Ces résultats confirment que le couplage excitation-contraction du muscle cardiaque est régi par des mécanismes très différents de celui du muscle squelettique et suggèrent que l'activation de RyR1 est directement liée au détecteur de potentiel et indépendante du rôle *in vivo* de FKBP12.

Cet article conduit à s'interroger sur le rôle de FKBP12 au cours du développement et dans les maladies car-

diaques. En fait, l'apparition de cette cardiopathie dilatée coïncide avec le développement et la maturation du réticulum sarcoplasmique chez l'embryon et on peut envisager que la présence de cette protéine serait un élément déterminant, non seulement du type de couplage, mais également de la mise en place d'un réticulum sarcoplasmique cardiaque fonctionnel. Différents travaux réalisés sur l'expression de RyR2 dans l'insuffisance ou l'hypertrophie cardiaque suggèrent que ce récepteur, en soi, ne jouait qu'un rôle réduit dans les altérations graves des mouvements calciques au cours de l'insuffisance cardiaque [9]. Un travail récent de Gomez *et al.* [10] sur les mouvements calciques au cours du couplage excitation-contraction chez des rats hypertendus a confirmé que les anomalies de la signalisation calcique n'étaient sans doute pas reliées à une expression modifiée des gènes de SERCA (*sarco[endo]plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase*) et de RyR2, mais plutôt à un remodelage de la diade et/ou à une augmentation de la distance entre DHPR et RyR2 (revue dans [11]). Une réévaluation de ces résultats au vu de l'article de Shou *et al.* est évidemment tentante et la désorganisation observée chez les souris déficientes en FKBP12 et développant une cardiopathie dilatée pourrait être assez voisine de celle observée chez des rats hypertendus, même si les deux affections ne présentent pas la même gravité.

Les articles de Gomez *et al.* puis de Shou *et al.* ont le grand mérite d'avoir montré que les principaux acteurs du couplage excitation-contraction du muscle cardiaque ne sont pas seuls en cause dans les anomalies de la signalisation calcique au cours du développement de l'insuffisance cardiaque et que l'absence d'une protéine régulatrice du canal calcique du réticulum sarcoplas-

mique jouait un rôle majeur au cours de l'organogenèse cardiaque en provoquant une cardiopathie de type dilatée. Il n'est pas certain que FKBP12 soit seul en cause, et d'autres protéines régulatrices capables de s'associer au RyR méritent certainement d'être étudiées.

D.C.

1. Fabiato A, Fabiato F. Calcium and cardiac excitation-contraction coupling. *Annu Rev Physiol* 1984; 41: 743-56.
2. Rios E, Pizzaro G. Voltage sensor of excitation-contraction coupling in skeletal muscle. *Physiol Rev* 1991; 71: 849-908.
3. Nargeot J, Charnet P. Diversité moléculaire des canaux calciques: du gène à la fonction. *Med Sci* 1994; 10: 1293-308.
4. Yamazawa T, Takeshima H, Sakurai T, Endo M, Iino M. Subtype specificity of the ryanodine receptor for Ca²⁺ signal amplification in excitation-contraction coupling. *EMBO J* 1996; 15: 6172-7.
5. Marks AR. Intracellular calcium-release channels: regulators of cell life and death. *Am J Physiol* 1997; 272: H597-605.
6. Shou W, Aghdasi B, Armstrong DL, Guo Q, Bao S, Chang MJ, Mathews LM, Schneider MD, Hamilton SL, Matzuk MM. Cardiac defects and altered ryanodine receptor function in mice lacking FKBP12. *Nature* 1998; 39: 489-92.
7. Takeshima H, Iino M, Takekura H, Nishi M, Kuno J, Minowa O, Takano H, Noda T. Excitation-contraction uncoupling and muscular degeneration in mice lacking functional skeletal muscle ryanodine-receptor gene. *Nature* 1994; 369: 556-9.
8. Brillantes AM, Ondrias K, Scott A, Kobrinsky E, Ondriasova E, Moschella MC, Jayaraman T, Landers M, Ehrlich BE, Marks AR. Stabilization of calcium release channel (ryanodine receptor) function by FK506-binding protein *Cell* 1994; 77: 513-23.
9. Sainte Beuve C, Allen PD, Dambrin G, Rannou F, Marty I, Trounev P, Bors V, Pavie A, Gandjibakch I, Charlemagne D. Cardiac calcium release channel in control and cardiomyopathic human hearts: mRNA and protein contents are differentially regulated. *J Mol Cell Cardiol* 1997; 29: 1237-46.
10. Gomez AL, Valdivia HH, Cheng H, Lederer MR, Cannell MB, McCune SA, Altschuld RA, Lederer WJ. Defective excitation-contraction coupling in experimental cardiac hypertrophy and heart failure. *Science* 1997; 276: 800-6.
11. Mercadier JJ, Hatem S. Recaptage ou relargage ? Ou les caprices de la signalisation calcique du myocyte dans l'hypertrophie et l'insuffisance cardiaques. *Med Sci* 1997; 13: 1454-8.

CONFÉRENCES JACQUES MONOD 1998

LA THÉORIE SYNTHÉTIQUE DE L'ÉVOLUTION : Bilan et perspectives pour le XXI^e siècle

ROSCOFF (France) - 26-30 octobre 1998

Président : PERIQUET Georges

Université François-Rabelais, Institut de Recherche sur la Biologie de l'Insecte (IRBI), Parc Grandmont, F-37200 Tours, France
Phone - Téléphone : + 33 2 47 36 69 67 - Fax - Télécopie : + 33 2 47 36 69 66. E-mail - Courrier électronique : periquet@univ-tours.fr

Conférenciers : Akam M., Ayala F., Bachmann L., Benton M., Boesch C., Bonhomme F., Brakefield P., Cariou M.-L., Carroll S., Cezilly F., Charlesworth D., Coyne J., Eldredge N., Ferrière R., Gautier C., Gayon J., Gingerich P., Gouyon P.-H., Harvey P., Hurst L., Keller L., Kidwell M., Maynard-Smith J., Pasteur N., Périquet G., Philippe H., Radman., Sharp P., Steams S., Thaler L.