

À propos du cheminement des ions Ca^{2+} au sein de l'ATPase du réticulum sarcoplasmique

Lorsqu'un ion franchit une membrane biologique, il est fréquent qu'il ait à vaincre, lors de cette étape, un gradient électrochimique défavorable à son déplacement. L'ion est placé dans cette situation lorsque la résultante des effets du gradient chimique et du gradient électrique crée une force qui s'oppose à son mouvement. Dans ce cas, son transfert nécessitant une dépense d'énergie, on parle de transport « actif », par opposition aux transports « passifs » qui se réfèrent aux déplacements favorisés par le gradient électrochimique. Les transports actifs facilités par des ATPases sont beaucoup plus lents que les transports passifs facilités par des pores. Typiquement, un canal ionique délivre 10^7 ions par seconde alors que l'ATPase- Ca^{2+} que nous allons décrire ici en accumule une centaine par seconde.

Lors d'un transport actif, l'énergie consommée résulte de la conversion par une ATPase membranaire de l'énergie chimique provenant de l'hydrolyse de l'ATP. Les ATPases assurant des transports d'ions de ce type appartiennent à la classe des ATPases de type P qui regroupe des protéines membranaires comme les ATPases- Ca^{2+} , l'ATPase- Na^+ , K^+ ou l'ATPase- H^+ , K^+ . Au cours de leur cycle de transport, ces ATPases sont phosphorylées de façon covalente par l'ATP, d'où leur nom générique.

Le réticulum sarcoplasmique est depuis longtemps considéré comme un système modèle pour l'étude du transport actif d'ions. Aujourd'hui, le rôle joué par le calcium en tant que messenger secondaire, ainsi que la découverte de nombreuses ATPases de type P dont l'ATPase- Ca^{2+} est le prototype, renforcent l'intérêt de ce modèle.

Dans les muscles squelettiques rapides, la membrane plasmique maintient la concentration intracellulaire de calcium libre au voisinage de $0,1 \mu M$. L'augmentation de la concentration de calcium induit la contraction de la cellule musculaire, tandis que le retour à la concentration de $0,1 \mu M$ induit la relaxation. Les changements de concentration sont assurés par le réticulum sarcoplasmique, organite spécialisé dans le stockage et le relargage rapides du calcium. Le « pompage » du calcium du cytoplasme vers l'intérieur du réticulum s'effectue contre un gradient électrochimique défavorable. Il est assuré par une ATPase- Ca^{2+} , protéine membranaire intrinsèque, majoritaire dans la membrane de cet organite, alors que le flux inverse de calcium qui suit le gradient électrochimique, passe par des canaux spécifiques, distincts de l'ATPase. Cette ATPase- Ca^{2+} assure donc la relaxation des muscles squelettiques en diminuant la concentration du calcium cytoplasmique. L'ATPase- Ca^{2+} , qui transporte deux calcium par cycle, peut concentrer cet ion dans l'espace interne du réticulum plus de 10^4 fois par rapport à la concentration cytoplasmique atteinte lors de la relaxation de la cellule musculaire.

L'ATPase- Ca^{2+} est formée de 994 acides aminés dont environ un tiers ancre la protéine dans la membrane par des hélices transmembranaires qui sont probablement au nombre de dix [1]. Le reste de la protéine, essentiellement localisé du côté cytoplasmique, contient le site de fixation de l'ATP et le site de phosphorylation, alors que les deux sites de fixation du calcium sont situés dans la membrane. Malgré plusieurs tentatives de cristallisation et un grand nombre d'études faisant

appel au marquage chimique, à la protéolyse ménagée et, plus récemment, à la mutagenèse dirigée [2], les structures de la protéine dans son ensemble et des sites de fixation de l'ATP et du calcium, en particulier, sont encore mal connus.

Les études fonctionnelles ont cependant permis d'avancer dans la compréhension du mécanisme du transport du calcium (figure 1) [3] (pour une revue récente, voir [4]). Le transport commence par la fixation de deux ions Ca^{2+} sur les sites de transport qui sont, à cette première étape, accessibles de la face cytoplasmique. Ces sites ont une forte affinité permettant la fixation du Ca^{2+} à des concentrations submicromolaires. Lors de la deuxième étape, l'ATPase est phosphorylée par l'ATP, phosphorylation qui occlut les sites de transport. Dans cet état, dit « occlus », les sites de transport ne sont plus accessibles et ont perdu leur forte affinité pour le calcium. Les deux Ca^{2+} liés ne peuvent alors que se dissocier lentement en direction de l'intérieur du réticulum (étape 3). Le cycle s'achève par la déphosphorylation de l'ATPase (étape 4) qui peut ensuite entamer un nouveau cycle. Le cycle de transport est totalement réversible : dans le mode inverse, l'ATPase catalyse la synthèse d'une molécule d'ATP couplée à la sortie de deux Ca^{2+} .

En l'absence d'ATP, la fixation des deux ions Ca^{2+} sur la face cytoplasmique est coopérative. Les deux sites sont en interaction, la fixation du premier Ca^{2+} augmentant l'affinité de la protéine pour le second. Cela implique que les deux Ca^{2+} se fixent de façon séquentielle et il est possible de bloquer un des deux calcium dans son site par le calcium du milieu cytoplasmique. Par exemple, après fixation de

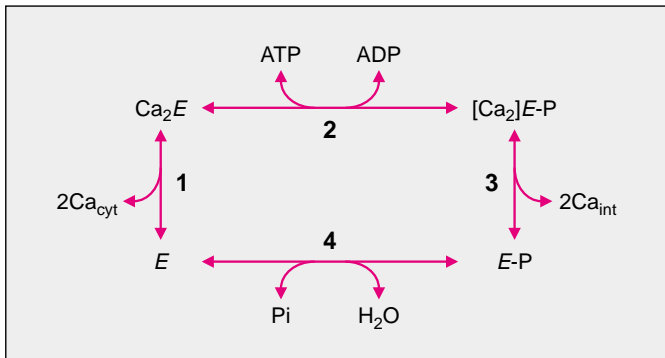


Figure 1. **Cycle de transport de l'ATPase-Ca²⁺.** Ce cycle à quatre étapes représente le mécanisme de couplage le plus simple entre un déplacement du calcium du cytoplasme vers l'intérieur du réticulum et la consommation d'une molécule d'ATP.

À l'étape 1, l'enzyme se charge sur la face cytoplasmique de deux ions Ca²⁺ avec une forte affinité. Lors de l'étape 2, l'enzyme chargée de calcium est phosphorylée par l'ATP qui se transforme en ADP. Cette phosphorylation occlut les sites de transport et (étape 3) le Ca²⁺ lié se dissocie lentement à l'intérieur du réticulum sarcoplasmique. La déphosphorylation de l'ATPase lors de l'étape 4 lui permet de refaire un cycle. Il faut noter que toutes ces réactions sont réversibles et que, dans le mode inverse, l'ATPase permet la synthèse d'une molécule d'ATP et la sortie de 2 ions Ca²⁺ du réticulum sarcoplasmique vers le cytoplasme. E, ATPase non phosphorylée, E-P, ATPase phosphorylée.

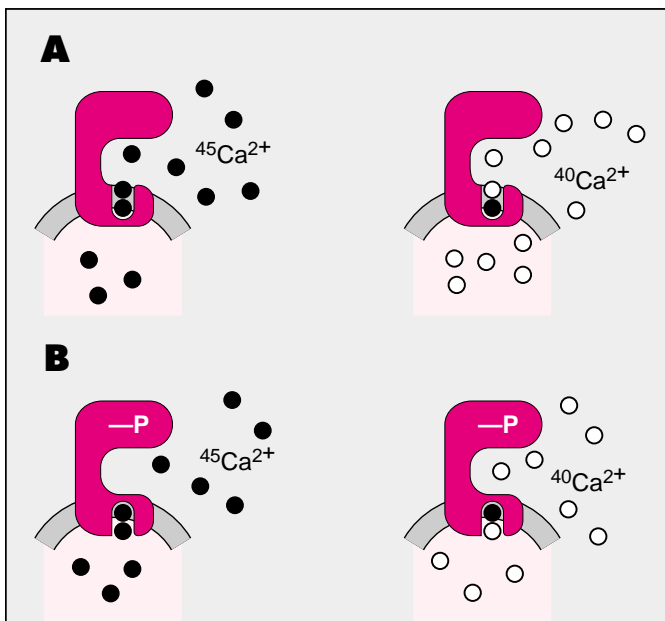


Figure 2. **A. Échange isotopique sur la face cytoplasmique.** L'ATPase, non phosphorylée, présente deux sites accessibles du cytoplasme. À gauche les deux sites sont occupés par du ⁴⁵Ca²⁺ (●). À droite, l'expérience est poursuivie par la chasse du ⁴⁵Ca²⁺ par un excès de ⁴⁰Ca²⁺ (○), qui remplace le ⁴⁵Ca²⁺ superficiel et bloque le ⁴⁵Ca²⁺ profond. **B. Échange isotopique sur la face interne.**

L'ATPase phosphorylée présente deux sites accessibles de l'intérieur du réticulum. À gauche, les deux sites sont occupés par du ⁴⁵Ca²⁺. À droite, l'expérience est poursuivie par la chasse du ⁴⁵Ca²⁺ par un excès de ⁴⁰Ca²⁺, qui remplace le ⁴⁵Ca²⁺ superficiel et bloque le ⁴⁵Ca²⁺ profond.

deux ⁴⁵Ca²⁺ (radioactifs), l'un d'entre eux peut être échangé contre du ⁴⁰Ca²⁺ (non radioactif) ajouté en excès dans le milieu [5]. Cet échange isotopique partiel est représenté sur la figure 2A par des sites empilés l'un sur l'autre dans une crevasse pour exprimer le fait

que la présence d'un ion ici superficiel, empêche l'échange du second. Cette caractéristique permet donc de différencier les deux ions selon l'ordre dans lequel ils se sont fixés.

Des expériences similaires d'échange isotopique peuvent être réalisées sur

la face interne de la membrane à condition de stabiliser préalablement le dérivé phosphorylé. Dans ces conditions, une ATPase phosphorylée avec ses deux sites occupés par du ⁴⁵Ca²⁺ n'échange là encore qu'un seul des deux ⁴⁵Ca²⁺ contre du ⁴⁰Ca²⁺ ajouté en excès dans le milieu interne [6], comme l'illustre la figure 2B.

Ainsi, que le calcium accède aux sites de transport par la face cytoplasmique ou la face interne, les calcium fixés ne s'échangent que par moitié lorsque l'on ajoute un excès de calcium dans le milieu. Cette propriété permet de réaliser « l'empilement » d'un ⁴⁰Ca²⁺ sur un ⁴⁵Ca²⁺ ou, à l'inverse, d'un ⁴⁵Ca²⁺ sur un ⁴⁰Ca²⁺, sur l'une ou l'autre des faces de la membrane. A partir d'une telle construction, on peut suivre le cheminement individuel de chacun des calcium au cours de la traversée de la membrane. Par exemple, après avoir effectué un empilement sur la face cytoplasmique, un ajout d'ATP provoque la phosphorylation de l'enzyme et la réorientation des sites de transport (étape 2). Un échange isotopique effectué sur la face interne permet alors de suivre selon le cas, le calcium du site profond ou le calcium du site superficiel lors de leur dissociation à l'intérieur du réticulum (étape 3). Pour explorer la migration inverse, c'est-à-dire le transport des calcium de l'intérieur du réticulum vers le cytoplasme et suivre l'ordre d'apparition des deux ions dans le cytoplasme, on induit la réversion du cycle par ajout d'un excès d'ADP à l'enzyme phosphorylée. Cela induit sa déphosphorylation et une synthèse d'ATP (étape 2) puis conduit à la dissociation des calcium dans le cytoplasme (étape 1). Dans ce cas également, l'ordre d'apparition des calcium est analysé par un échange isotopique du côté cytoplasmique, le milieu d'arrivée.

On s'aperçoit ainsi que tel ordre pré-établi sur une face de la membrane n'est pas conservé pendant la traversée et ce, quelque soit le sens de la migration. Alors que l'on peut identifier l'un des deux calcium comme le premier fixé du côté cytoplasmique (● sur la figure 3A), ce calcium a autant de chance d'apparaître en premier qu'en second du côté interne du réticulum. De même, si sur la face interne un ⁴⁵Ca²⁺ radioactif (● sur la

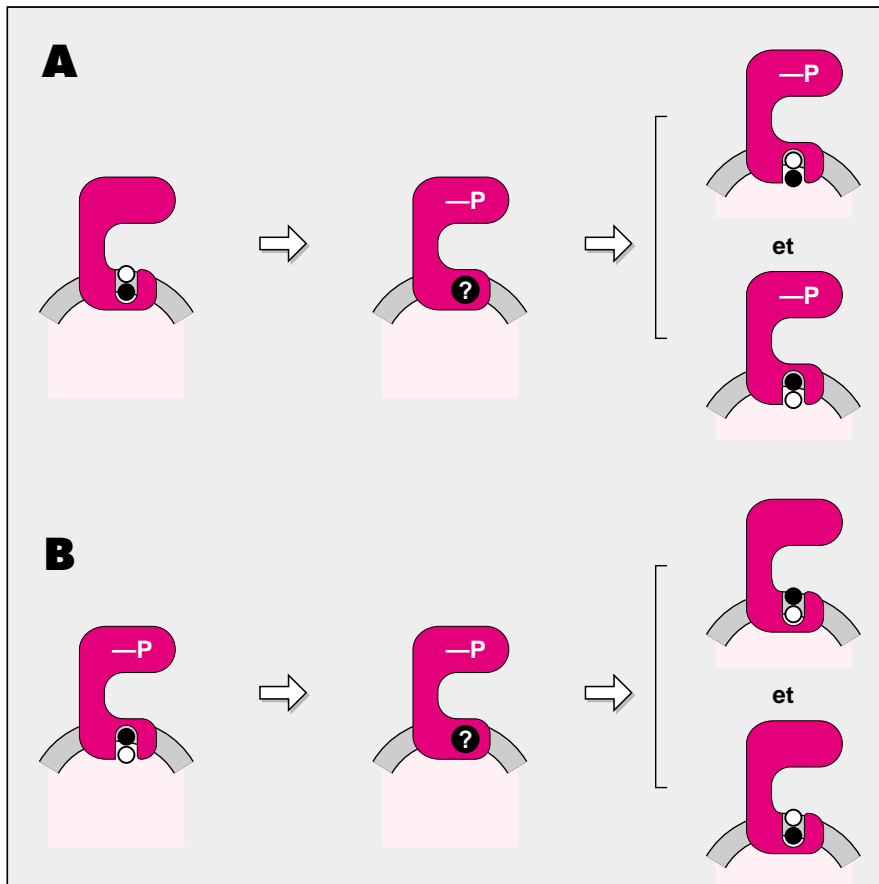


Figure 3. **A. Transport du cytoplasme vers l'intérieur du réticulum.** À gauche, les ions Ca^{2+} se sont fixés selon l'ordre décrit figure 2A, le $^{45}\text{Ca}^{2+}$ s'est donc fixé le premier sur la face cytoplasmique (●), l'ion $^{40}\text{Ca}^{2+}$ (○) en second. Au centre, les sites de transport sont occlus et l'ordre de fixation des calcium est perdu. À droite, le $^{45}\text{Ca}^{2+}$ apparaît soit en premier, soit en second sur la face interne du réticulum. **B. Transport de l'intérieur du réticulum vers le cytoplasme.** À gauche, les calcium se sont fixés selon l'ordre décrit figure 2B, le $^{45}\text{Ca}^{2+}$ (●) s'est donc fixé le premier sur la face interne de l'ATPase phosphorylée. Au centre, les sites de transport sont occlus et l'ordre de fixation des calcium est perdu. À droite, le $^{45}\text{Ca}^{2+}$ apparaît soit en premier, soit en second sur la face cytoplasmique.

figure 3B) est bloqué par un $^{40}\text{Ca}^{2+}$ on ne reconnaît plus cet ordre lors de leur apparition du côté cytoplasmique après réversion du cycle. La perte d'un ordre préétabli au cours de la traversée de la membrane montre donc l'intervention d'un processus de mélange au cours des réactions de phosphorylation par l'ATP ou de synthèse d'ATP [7] (figures 3A et 3B).

Revenons aux données structurales indiquant que la partie membranaire de la protéine est formée de dix hélices transmembranaires dont trois au moins participent au transport. Qu'ils soient réalisés sur l'enzyme non

phosphorylée (figure 2A) ou sur l'enzyme phosphorylée (figure 2B), c'est-à-dire sur la face cytoplasmique ou sur la face interne, les échanges isotopiques partiels suggèrent un empilement des calcium dans une crevasse. Une fixation cytoplasmique séquentielle suivie d'une dissociation interne également séquentielle suggèrent que les ions calcium cheminent en file indienne dans un canal étroit, qui pourrait être formé par les trois hélices impliquées dans la fixation du calcium.

A ce stade, le nombre de sites calcium par molécule est encore l'une des

inconnues majeures. Est-ce une seule et même paire de sites qui se trouve alternativement sur une face ou l'autre de la membrane ou encore, les deux ions calcium migrent-ils d'une paire de sites accessible du côté cytoplasmique à une seconde paire de sites accessible de l'intérieur du réticulum [8]? Une autre interrogation importante vient du fait que la perte de l'ordre initial de fixation des deux calcium au cours de leur migration n'est pas compatible avec un passage des ions en file indienne.

Il faut considérer ici le caractère « actif » du transport. Le passage d'un calcium contre son gradient de concentration impose successivement une interdiction du retour de l'ion vers le cytoplasme, une forte baisse de l'affinité des sites de transport et un changement d'orientation de l'accès à ces sites. Tout ou partie de ces événements ont lieu pendant l'occlusion induite par la phosphorylation. Or l'aspartate 351, qui est le résidu phosphorylé par l'ATP, est à une quarantaine d'ångströms de la membrane. Le couplage entre le phénomène vectoriel de migration des calcium au travers de la membrane et la réaction chimique de phosphorylation qui a lieu dans la partie cytoplasmique, se traduit par un changement de conformation se propageant à longue distance pour provoquer un relâchement de la structure des sites de transport et aboutir à la perte de l'ordre initial de fixation des calcium. En l'absence de données cristallographiques livrant la structure de l'ATPase- Ca^{2+} , la modélisation moléculaire devra prendre en compte cette notion de mélange des ions qui s'oppose à la conservation de l'ordre du passage par un canal étroit ■

**Elisabeth Mintz
Florent Guillain**

Commissariat à l'énergie atomique et Ura Cnrs 2096, section de biophysique des protéines et des membranes, département de biologie cellulaire et moléculaire, Centre d'études nucléaires de Saclay, 91191 Gif-sur-Yvette Cedex, France.

TIRÉS À PART

E. Mintz.

RÉFÉRENCES

1. MacLennan DH, Brandl CJ, Korczak B, Green NM. Amino-acid sequence of a Ca^{2+} - Mg^{2+} -dependent ATPase from rabbit muscle sarcoplasmic reticulum, deduced from its complementary DNA sequence. *Nature* 1985 ; 316 : 696-700.
2. Andersen JP. Dissection of the functional domains of the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase by site-directed mutagenesis. *Biosci Rep* 1995 ; 15 : 243-61.
3. De Meis L, Vianna AL. Energy interconversion by the Ca^{2+} -dependent ATPase of the sarcoplasmic reticulum. *Annu Rev Biochem* 1979 ; 48 : 275-92.
4. Mintz E, Guillain F. Ca^{2+} transport by the sarcoplasmic reticulum ATPase. *Biochim Biophys Acta* 1997 (sous presse).
5. Dupont Y. Low-temperature studies of the sarcoplasmic reticulum calcium pump. Mechanism of calcium binding. *Biochim Biophys Acta* 1982 ; 688 : 75-87.
6. Forge V, Mintz E, Canet D, Guillain F. Lumenal Ca^{2+} dissociation from the phosphorylated Ca^{2+} -ATPase of the sarcoplasmic reticulum is sequential. *J Biol Chem* 1995 ; 270 : 18271-6.
7. Canet D, Forge V, Guillain F, Mintz E. Ca^{2+} translocation across sarcoplasmic reticulum ATPase randomizes the two transported ions. *J Biol Chem* 1996 ; 271 : 20566-72.
8. Jencks WP. The mechanism of coupling chemical and physical reactions by the calcium ATPase of sarcoplasmic reticulum and other coupled vectorial systems. *Biosci Rep* 1995 ; 15 : 283-7.