

Les protéines G étendent leur pouvoir sur les canaux ioniques

Les protéines G (liant le GTP) constituent une famille de protéines homologues assurant le couplage à leurs effecteurs cellulaires de récepteurs aussi divers que la rhodopsine, les récepteurs adrénergiques ou les récepteurs aux odeurs. On pensait, il y a peu de temps encore, que ces protéines G ne contrôlaient que des effecteurs enzymatiques produisant ou dégradant des seconds messagers. Or, depuis deux ans, on a découvert que ces protéines assuraient aussi le couplage direct entre des récepteurs membranaires et des canaux ioniques. Il apparaît, de plus, qu'un récepteur donné n'exécute pas une seule voie de couplage mais exécute tout un programme de transduction auquel coopèrent parfois plusieurs protéines G, chacune d'entre elles pouvant avoir plusieurs cibles dont l'activité est stimulée ou inhibée.

Joël Bockaert

RÉFÉRENCES

1. Bockaert J. Les récepteurs membranaires. *La Recherche* 1986 ; 17 : 892-900.
2. Neer EJ, Clapham DE. Role of G protein structures in transmembrane signalling. *Nature* 1988 ; 333 : 129-34.
3. Homburger V, Brabet P, Audigier Y, Pantaloni C, Bockaert J, Rouot B. Immunological localisation of the GTP binding protein G_o in different tissues of vertebrates and invertebrates. *Mol Pharmacol* 1987 ; 31 : 313-9.
4. Brabet P, Dumuis A, Sebben M, Pantaloni C, Bockaert J, Homburger V. Immunocytochemical localisation of the guanine nucleotide binding protein G_o in primary cultures of neuronal and glial cells. *J Neurosci* 1988 ; 8 : 701-8.

ADRESSE

J. Bockaert : directeur de recherche au Cnrs. Centre Cnrs-Inserm de pharmacologie-endocrinologie, rue de la Cardonille, 34094 Montpellier Cedex 2, France.

L'évolution des êtres pluricellulaires est liée à la capacité qu'ont su développer leurs cellules à communiquer entre elles.

Cette communication se fait par l'intermédiaire de messagers divers (hormones, neurotransmetteurs, facteurs de croissance) dont un grand nombre ne pénètre pas dans la cellule. Ces messagers sont reconnus par des récepteurs membranaires dont la stimulation induit une cascade d'événements biophysiques et biochimiques qui aboutiront à un changement d'une ou plusieurs propriétés de la cellule (contraction, division cellulaire, sécrétion, etc.) [1].

Une des découvertes les plus inattendues de ces cinq dernières années est que des récepteurs aussi différents que les récepteurs à la lumière (rhodopsine), les récepteurs adrénergiques et à beaucoup d'autres hormones ou neurotransmetteurs, ainsi que les récepteurs aux odeurs, agissent par l'intermédiaire de protéines membranaires de structures très homologues, liant le GTP et appelées protéines G [2]. Une fois activée par le récepteur, la protéine G qui lui est spécifiquement associée va

modifier l'activité d'une ou plusieurs enzymes aussi diverses que l'adénylate cyclase, les phospholipases C ou A_2 ou une phosphodiesterase activée par le GMPc. Jusqu'à ces trois dernières années, on ne connaissait que trois protéines G : G_s , G_i — assurant respectivement le couplage positif et négatif de certains récepteurs avec l'adénylate cyclase — et la protéine G_o , aussi appelée transducine, assurant le couplage entre la rhodopsine et la phosphodiesterase dépendante de la GMPc des bâtonnets et des cônes rétiniens [2].

La découverte récente de nombreuses autres protéines G, comme G_o , une protéine G très abondante dans les cellules nerveuses et certaines autres cellules excitables [3, 4], G_p assurant le couplage entre le récepteur et la phospholipase C, G_{ins} , intervenant dans l'action du récepteur de l'insuline, le fait qu'il existe des isoformes pour beaucoup d'entre elles (trois pour G_i , deux pour G_o , quatre pour G_s) ainsi que l'idée que beaucoup d'autres restent à découvrir, ont changé radicalement nos conceptions sur leur rôle.

Les protéines G apparaissent à tort ou à raison comme le *deus ex*

machina impliqué dans la régulation d'une vaste catégorie de processus de transduction, non seulement entre l'extérieur et l'intérieur de la cellule, mais aussi entre les différents compartiments membranaires de la cellule [5].

Les protéines G

Structure des protéines G. Les protéines G assurant la transduction des récepteurs membranaires sont composées de trois sous-unités ; la sous-unité α (39 à 52 kDa), la sous-unité β (35 et 36 kDa) et la sous-unité γ (environ 5 à 8 kDa).

La sous-unité α est l'élément spécifique de chaque protéine G et contient le site GTP. Il n'existe que deux sous-unités β pour toutes les protéines G (35 et 36 kDa). Parmi les sous-unités γ possibles, seule la sous-unité γ de G_i a été purifiée et son ADNc cloné. C'est une protéine hydrophile, alors que les autres sous-unités γ sont hydrophobes. Les sous-unités β et γ sont toujours étroitement associées et ne sont probablement jamais dissociées *in vivo* (figure 1). Seule la sous-unité γ des protéines G autres que G_i pourrait être une protéine membranaire intrinsèque. Les sous-unités α et β sont parfaitement hydrophiles. Malgré cela, il est vraisemblable que les sous-unités α peuvent adhérer à la membrane même une fois dissociées

ABRÉVIATIONS

GTP : guanosine triphosphate

GDP : guanosine diphosphate

Protéines G : protéines liant le GTP

PTx : toxine de Bordetella pertussis

CT : cholera toxine

AMPC : adénosine 3',5' monophosphate cyclique

GMPc : guanosine 3', 5' monophosphate cyclique

kinase A : protéine kinase AMPC dépendante

NT : neurotransmetteur

GABA : acide γ -aminobutyrique

AC : adénylate cyclase

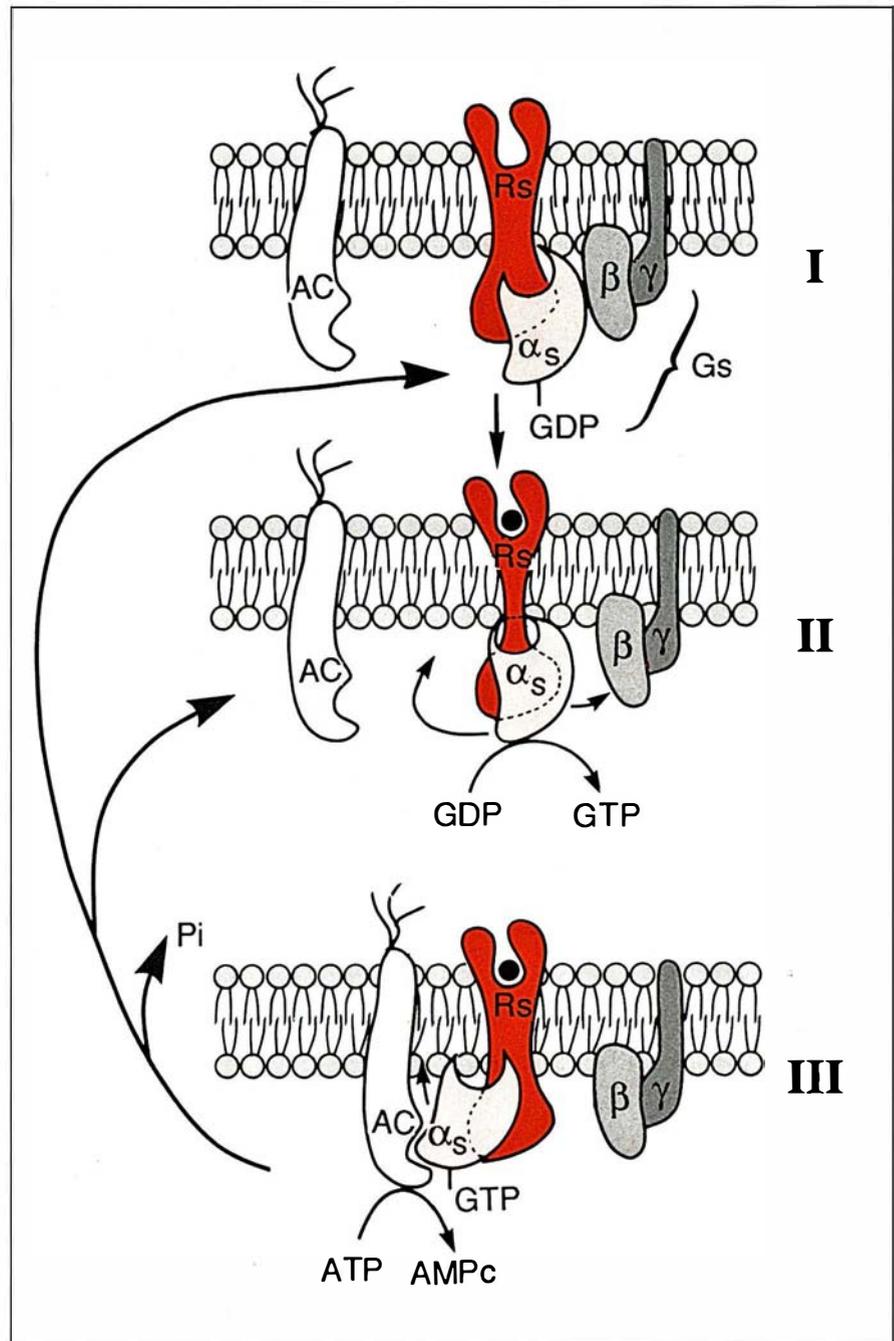


Figure 1. **Mécanisme d'activation de l'adénylate cyclase (AC) par un récepteur stimulateur (Rs) par l'intermédiaire de la protéine liant le GTP (protéine G) de type G_s .** I. En l'absence d'agonistes, la protéine G_s est sous une forme trimérique $\alpha_s\beta\gamma$. Le site nucléotidique d' α_s est occupé par du GDP. Les sous-unités α et β sont des molécules hydrophiles qui sont cependant fortement associées à la membrane. La sous-unité γ est hydrophobe et intervient peut-être dans l'ancrage de G_s . La sous-unité γ est représentée ici sous forme transmembranaire. Cela est une hypothèse. Il n'est pas du tout certain que G_s soit en interaction avec Rs en l'absence d'agonistes. II. En présence d'agoniste (\bullet), le récepteur change de conformation, interagit avec G_s et catalyse l'échange GDP \rightarrow GTP sur α_s . III. Une fois chargée de GTP, la sous-unité α_s -GTP se dissocie de $\beta\gamma$ et va interagir avec l'AC pour l'activer. La réversibilité du système est assurée par l'hydrolyse du GTP. G_s est une GTPase. On retourne alors à l'état II, si le récepteur est encore occupé par l'agoniste, ou à l'état I, s'il ne l'est plus. Un récepteur occupé peut activer de nombreuses protéines G, ce qui assure une étape d'amplification.

RÉFÉRENCES

5. Bourne HR. Do GTPases direct membrane traffic in secretion? *Cell* 1988; 53 : 669-71.
 6. Fong HKW, Yoshimoto KK, Eversole-Cire P, Simon MI. Identification of a GTP binding protein α subunit that lacks an apparent ADP-ribosylation site for pertussis toxin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85 : 3066-70.
 7. Kozasa T, Itoh H, Tsukamoto T, Kaziro Y. Isolation and characterization of the human $G_s\alpha$ gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85 : 2081-5.
 8. De Vos AM, Tong L, Milburn MV, et al. Three dimensional structure of an oncogene protein : catalytic domain of human C-H ras p21. *Science* 1988; 239 : 888-93.
 9. Touchot N, Chardin P, Tativian A. Four additional members of the ras gene superfamily isolated by oligonucleotide strategy: Molecular cloning of YPT-related cDNA from a rat brain library. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84 : 8210-4.
 10. Guy B, Kieng MP, Riviere Y, et al. HIV F/3' orf encodes a phosphorylated GTP binding protein resembling an oncogene product. *Nature* 1987; 330 : 266-9.
 11. Reuter H. Calcium channel modulation by neurotransmitters, enzymes and drugs. *Nature* 1983; 301 : 569-74.
 12. Hosey MM, Ladzunski M. Calcium channels : molecular pharmacology, structure and regulation. *J Membr Biol* 1988; 104 : 81-105.
 13. Deterre P, Paupardin-Tritsch D, Bockaert J, Gerschenfeld HM. cAMP mediated decrease in K^+ conductance evoked by serotonin and dopamine in the same neuron : a biochemical and physiological single cell study. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; 79 : 7934-8.
 14. Goelet P, Castellucci VF, Schacher S, Kandel F. The long and the short of long term memory : a molecular framework. *Nature* 1986; 322 : 419-22.
 15. Hammond C, Paupardin-Trisch D, Nairn AC, Greengard P, Gerschenfeld HM. Cholecystokinin induces a decrease in Ca^{++} current in snail neurons that appears to be mediated by protein kinase C. *Nature* 1987; 325 : 809-911.
 16. Fesenko EE, Kolesnikov SS et Lyubarky AL. Induction by cyclic GMP of a cationic conductance in plasma membrane of retinal rod outer segment. *Nature* 1985; 313 : 310-3.
 17. Gold GH, Nakamura T. Cyclic nucleotide gated conductances : a new class of ion channels mediates visual and olfactory conductance. *TIPS* 1987; 8 : 312-6.
- de $\beta\gamma$, une situation qui se produit lors de l'activation des protéines G par les récepteurs (*figure 1*).

Activation des protéines G par les récepteurs. Le modèle d'activation des protéines G par les récepteurs membranaires est essentiellement fondé sur nos connaissances concernant l'activation de G_s (*figure 1*). Avant stimulation du récepteur par l'agoniste, G_s est sous forme d'un hétérotrimère $\alpha\beta\gamma$. Le site liant les guanylnucléotides est occupé par du GDP. Après activation par les agonistes, le récepteur change de conformation et interagit avec G_s . Il joue alors le rôle de catalyseur et stimule l'échange GDP-GTP. L'introduction du GTP sur $G_s\alpha$ entraîne la dissociation entre $G_s\alpha$ -GTP d'un côté et $\beta\gamma$ de l'autre. $G_s\alpha$ -GTP active alors l'adénylate cyclase. L'activation de l'adénylate cyclase cesse lors de l'hydrolyse du GTP en GDP. Le temps moyen d'occupation d'un récepteur par l'agoniste permet à celui-ci d'activer de nombreuses protéines G. Cela assure une étape d'amplification.

Les protéines G, site d'action de toxines. Les toxines bactériennes du *Vibrio cholerae* (CT) et de *Bordetella pertussis* (PTx) peuvent modifier de façon covalente les sous-unités α de certaines protéines G. Ces toxines sont des enzymes de type ADP-ribosyltransférase qui catalysent le transfert de l'ADP-ribose du NAD^+ sur la sous-unité α . Les protéines G peuvent être divisées en quatre groupes, celles qui sont uniquement des substrats de la CT (G_s), celles qui sont uniquement des substrats de la PTx (G_o et G_i), celles qui sont des substrats des deux (G_i) et celles qui sont des substrats d'aucune (G_q) [6]. La CT active G_s , alors que la PTx inhibe le couplage entre les protéines G et les récepteurs qui leur sont associés. La PTx est donc un bon outil pour démontrer le couplage entre un récepteur et une protéine G.

Les protéines G, une famille nombreuse. La purification des protéines G et le clonage de leurs ADNc ont révélé l'existence d'une variété de sous-unités α . Il y a quatre formes de $G_s\alpha$ obtenues à partir de l'épissage

différentiel d'un seul messenger pré-curseur [7]. Il y a au moins trois types de sous-unités α de G_i , appelées $G_i\alpha_1$ (41 kDa), $G_i\alpha_2$ (40 kDa), $G_i\alpha_3$ (41 kDa), deux types de $G_o\alpha$ (39 kDa) (travaux non publiés du laboratoire), deux types de $G_q\alpha$, l'une présente dans les bâtonnets, l'autre dans les cônes [2]. D'autres sous-unités α sont encore à découvrir, notamment G_p , assurant le couplage récepteur-phospholipase C.

En dehors des protéines G hétérotrimériques, il existe d'autres familles de protéines G dont l'homologie avec les premières se situe surtout au niveau du site de liaison du GTP [8]. Ces familles comprennent les protéines de type Ras, Rho, Ral, Rab des cellules eucaryotes [9], les protéines YPT1 et SEC4 [5] de la levure, la protéine F du virus HIV [10], les facteurs d'élongation et d'initiation des protéines. Leurs rôles pourraient être divers, transduction des effets des facteurs de croissance (Ras), transport vectoriel de substrats (facteurs d'initiation et d'élongation) ou de vésicules membranaires (YPT1 et SEC4) [5].

Protéines G et canaux ioniques

Contrôle indirect des canaux ioniques par les protéines G. Les canaux ioniques entrent classiquement dans deux catégories. Dans la première, le canal ionique et le site de reconnaissance du neurotransmetteur sont portés par la même molécule (*figure 2A*). Cette catégorie comprend les récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine, les récepteurs GABA A de l'acide γ -aminobutyrique (GABA), les récepteurs à la glycine. L'interaction du neurotransmetteur avec son site de liaison entraîne un changement de conformation qui laisse passer des ions dans le canal. Dans la deuxième catégorie, le canal est situé sur une molécule distincte de celle que reconnaît le neurotransmetteur. Deux types de couplage existent. Le premier est maintenant bien établi (*figure 2B*). Le récepteur, une fois activé, interagit avec une protéine G qui elle-même active une enzyme qui produit un second messenger. Les protéines G les plus souvent rencontrées dans ce type de couplage sont G_s (qui stimule l'adénylate cyclase) et G_p (qui

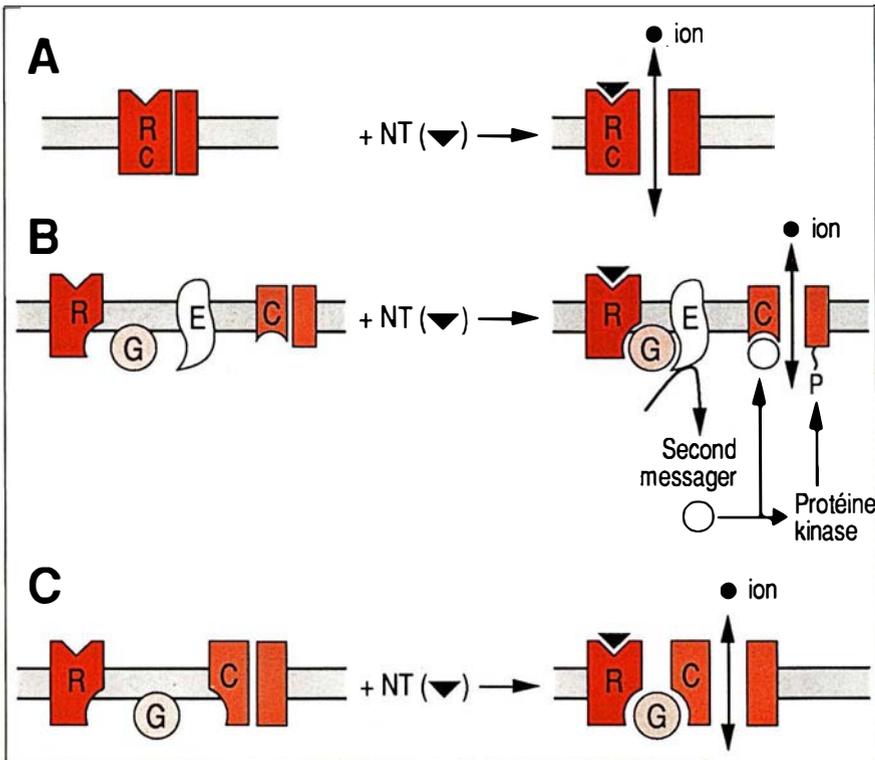


Figure 2. **Les différents mécanismes de contrôle des canaux ioniques par des récepteurs membranaires.** **A.** Le récepteur (R) et le canal ionique (C) font partie de la même molécule. Le neurotransmetteur (NT) une fois fixé sur cette molécule ouvre le canal ionique. Les récepteurs de ce type les mieux connus sont les récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine, les récepteurs NMDA du glutamate et les récepteurs GABA_A du GABA. **B.** Le récepteur active (ou inhibe) une enzyme (E) qui va produire un second messenger. Celui-ci active une protéine kinase qui, en phosphorylant le canal ionique (la protéine kinase peut, au contraire, activer des phosphatases qui déphosphorylent le canal ionique), modifie son activité. Le cas le mieux connu de ce type de transduction est le contrôle des canaux Ca⁺⁺ cardiaques par la noradrénaline [11]. Le second messenger peut aussi activer ou inhiber directement le canal ionique. Le cas le mieux connu de ce type de transduction est la régulation du canal Na⁺ des bâtonnets rétiens par le GMPc [16]. **C.** Le récepteur est directement couplé, par l'intermédiaire d'une protéine G, au canal ionique. Le cas le mieux connu de ce type de transduction est le contrôle des canaux K⁺ par le récepteur muscarinique cardiaque de l'acétylcholine [20].

stimule la phospholipase C) assurant la production respectivement de l'AMPc et d'inositol triphosphate (IP₃)/diacylglycérol (DAG). Parmi les autres seconds messagers impliqués dans le contrôle de l'activité des canaux ioniques, citons le GMPc et l'acide arachidonique et ses dérivés. Comment les seconds messagers contrôlent-ils l'activité des canaux ? Les mécanismes classiques sont illustrés (figure 2B). Le second messenger peut activer une protéine kinase qui phosphorylera directement le canal. L'exemple le mieux connu de ce type

de régulation est l'augmentation de l'activité des canaux Ca⁺⁺ voltage-dépendants des cellules cardiaques par la noradrénaline [11] (figure 3B). Cette augmentation est responsable de l'augmentation du rythme et de la force des contractions cardiaques induites par la noradrénaline. On sait depuis longtemps que la noradrénaline augmente l'amplitude et la durée du potentiel cardiaque. L'injection d'AMPc ou de l'unité catalytique de la protéine kinase stimulée par l'AMPc (kinase A) dans les myocytes reproduit les effets de la noradré-

line. On sait, d'autre part, que les canaux Ca⁺⁺ sont phosphorylés par diverses kinases dont la kinase A [12]. Des études utilisant la méthode de *patch-clamp* (voir *m/s* n° 9, vol. 3, p. 538) en configuration *cell-attached* (figure 4A) ont bien montré que le signal nécessaire à l'ouverture du canal Ca⁺⁺ est la dépolarisation brève (canal voltage-dépendant), mais que la noradrénaline ou l'AMPc augmente la probabilité d'ouverture du canal pour une dépolarisation donnée. Parmi les autres canaux dont l'activité est modulée par l'AMPc, citons un canal K⁺ impliqué dans la libération des neuromédiateurs de certains neurones de mollusques [13] et qui joue un rôle important dans les phénomènes de mémoire élémentaires [14]. Parmi les canaux inactivés et le DAG (qui active une kinase C), citons les canaux Ca⁺⁺-voltage-dépendants [15] mais aussi certains canaux K⁺.

Le deuxième mécanisme par lequel un second messenger peut contrôler l'activité d'un canal a été découvert très récemment par Fesenko [16]. Il s'agit d'une interaction directe du second messenger avec le canal (figure 2B). Fesenko a pu montrer un effet direct du GMPc sur l'activité du canal Na⁺ des bâtonnets rétiens. Pour cela, il a utilisé la version *inside-out* de la technique de *patch-clamp* qui permet d'arracher un petit fragment de membrane qui reste accolé à la pipette (1 µm de diamètre) (figure 4A). Ce fragment de membrane contient un ou plusieurs canaux dont on peut mesurer l'activité. Elle permet de manipuler la composition des milieux baignant les faces cytoplasmique (bain dans lequel est placée la pipette) et extracellulaire (liquide de la pipette). Fesenko a montré que le GMPc, mis dans le bain, ouvre les canaux Na⁺ du fragment de membrane accolé à la pipette [16]. Cela exclut *a priori* un effet indirect et l'intervention d'une kinase dépendante de la GMPc. De même, les canaux Na⁺ de la muqueuse olfactive sont directement activés par l'AMPc et le GMPc [17]. Il existe aussi des arguments en faveur d'un effet direct de l'IP₃ sur des canaux Ca⁺⁺ [18].

Contrôle direct des canaux ioniques par les protéines G. Le deuxième

RÉFÉRENCES

18. Kuno M, Gorony J, Weyand C, Gardner P. Single channel and whole cell recordings of mitogen regulated inward currents in human cloned helper lymphocytes. *Nature* 1986 ; 323 : 269-73.

19. Pfaffinger PJ, Martin JM, Hunter DD, Nathanson NN, Hille B. GTP binding proteins couple cardiac muscarinic receptors to a K⁺ channel. *Nature* 1985 ; 317 : 536-8.

20. Yatani A, Codina J, Brown AM, Birnbaumer L. Direct activation of mammalian atrial muscarinic potassium channels by GTP regulatory protein G_k. *Science* 1987 ; 235 : 207-11.

21. Kim D, Lewis DL, Graziadei L, Neer EJ, Bar-Sagi D, Clapham DE. G protein βγ subunits activate the cardiac muscarinic K⁺ channel via phospholipase A₂. *Nature* 1989 ; 337 : 557-60.

22. Yatani A, Mattera R, Codina J, et al. The G protein gated atrial K⁺ channel is stimulated by three distinct G_iα subunits. *Nature* 1988 ; 336 : 680-2.

23. Yatani A, Imoto Y, Codina J, Hamilton SL, Brown AM, Birnbaumer L. The stimulatory G protein of adenylyl cyclase, G_s also stimulates dihydropyridine-sensitive Ca⁺⁺ channels. *J Biol Chem* 1988 ; 263 : 9887-95.

24. Harris-Warrick RM, Hammond C, Paupardin-Tritsch D, et al. An α-40 subunit of a GTP binding protein immunologically related to G_o mediates a dopamine induced decrease of Ca⁺⁺ current in snail neurons. *Neuron* 1988 ; 1 : 27-32.

25. Hescheler J, Rosenthal W, Trautwein W, Schultz G. The GTP binding protein, G_o, regulates neuronal calcium channels. *Nature* 1987 ; 325 : 445-7.

26. Van Dongen AMJ, Codina J, Olate J, et al. Newly identified brain potassium channels gated by the guanine nucleotide binding protein G_o. *Science* 1988 ; 242 : 1433-7.

27. Journot L, Homburger V, Pantaloni C, Priam M, Bockaert J, Enjalbert A. An islet activating sensitive G protein is involved in dopamine inhibition of angiotensin and TRH-stimulated inositol phosphate production in anterior pituitary cells. *J Biol Chem* 1987 ; 262 : 15106-10.

28. Farfel Z, Brothers VM, Brickman AS, Conte F, Neer R, Bourne HR. Pseudohypoparathyroidism patients: evidence that distinct receptor cyclase coupling proteins mediate stimulation and inhibition of adenylyl cyclase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981 ; 78 : 3098-102.

29. Vallar L, Spada A, Giannattasio G. Altered G_s and adenylyl cyclase activity in human GH-secreting pituitary adenomas. *Nature* 1987 ; 330 : 566-8.

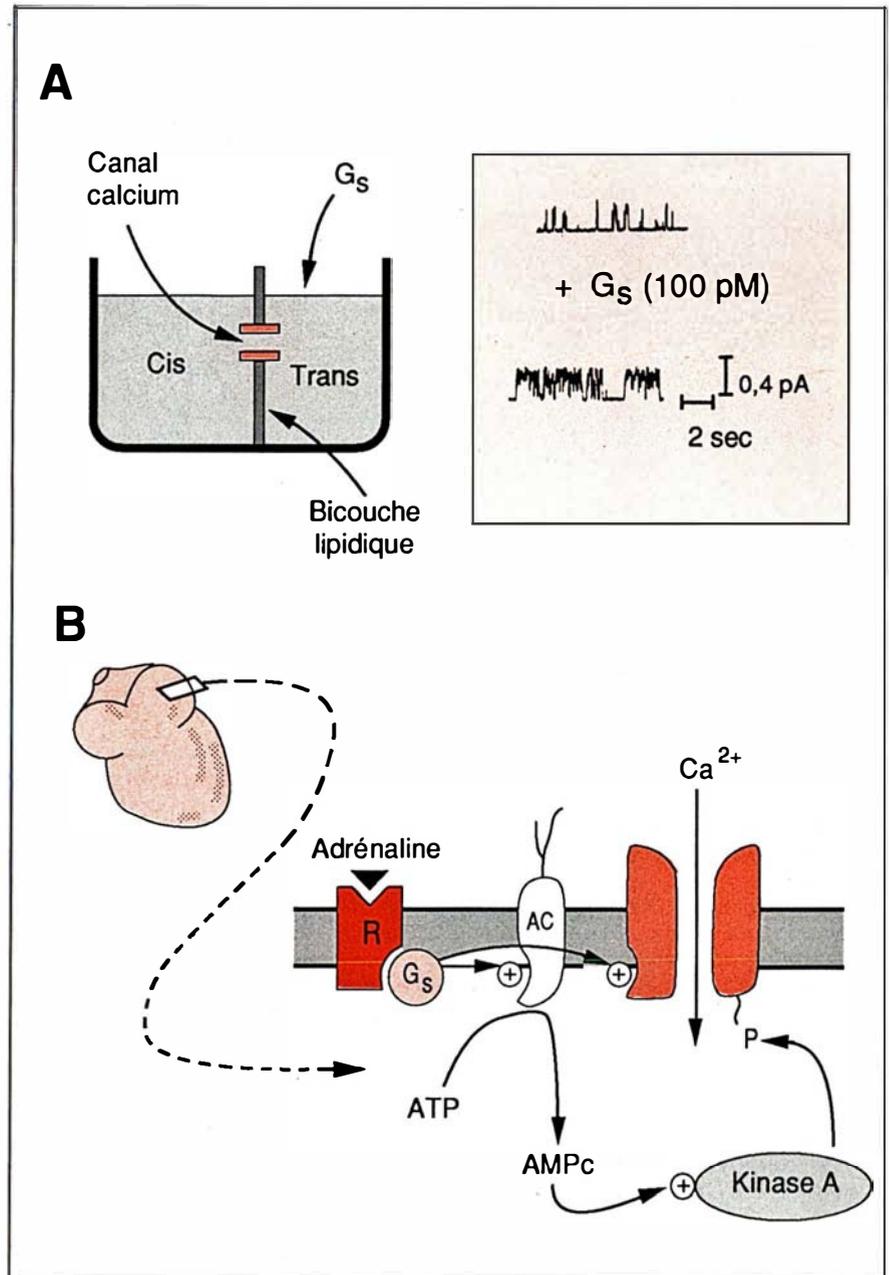


Figure 3. **Contrôle des canaux Ca⁺⁺-voltage-dépendants par la protéine G_s et la protéine kinase A.** **A.** Une bicouche lipidique (phosphatidyléthanolamine et phosphatidylsérine) est insérée entre deux compartiments cis et trans. Des vésicules membranaires contenant des canaux Ca⁺⁺-voltage-dépendants sont introduites dans le compartiment cis. De façon aléatoire, des canaux Ca⁺⁺ de ces vésicules fusionnent avec la bicouche. On peut alors enregistrer l'activité de canaux élémentaires. Lorsque la protéine G_s (100 pM) activée par le GTP-γ-S (afin d'obtenir la dissociation entre G_sα-GTP-γ-S et βγ) est introduite dans le compartiment trans, la fréquence d'ouverture des canaux Ca⁺⁺-voltage-dépendants augmente (d'après [23]). **B.** Au niveau du cœur, l'augmentation de l'activité des canaux Ca⁺⁺-voltage-dépendants par la noradrénaline pourrait se faire par deux voies. L'une est maintenant classique. Le récepteur β-adrénergique active l'adenylyl cyclase par l'intermédiaire de G_s, comme nous l'avons décrit dans la figure 1. L'AMPc active une protéine kinase A. La phosphorylation, par la protéine kinase A, du canal Ca⁺⁺ augmente son activité. L'autre voie, moins classique, est suggérée par l'expérience décrite en A. Le récepteur β-adrénergique active la protéine G_s et celle-ci va directement activer le canal Ca⁺⁺-voltage-dépendant.

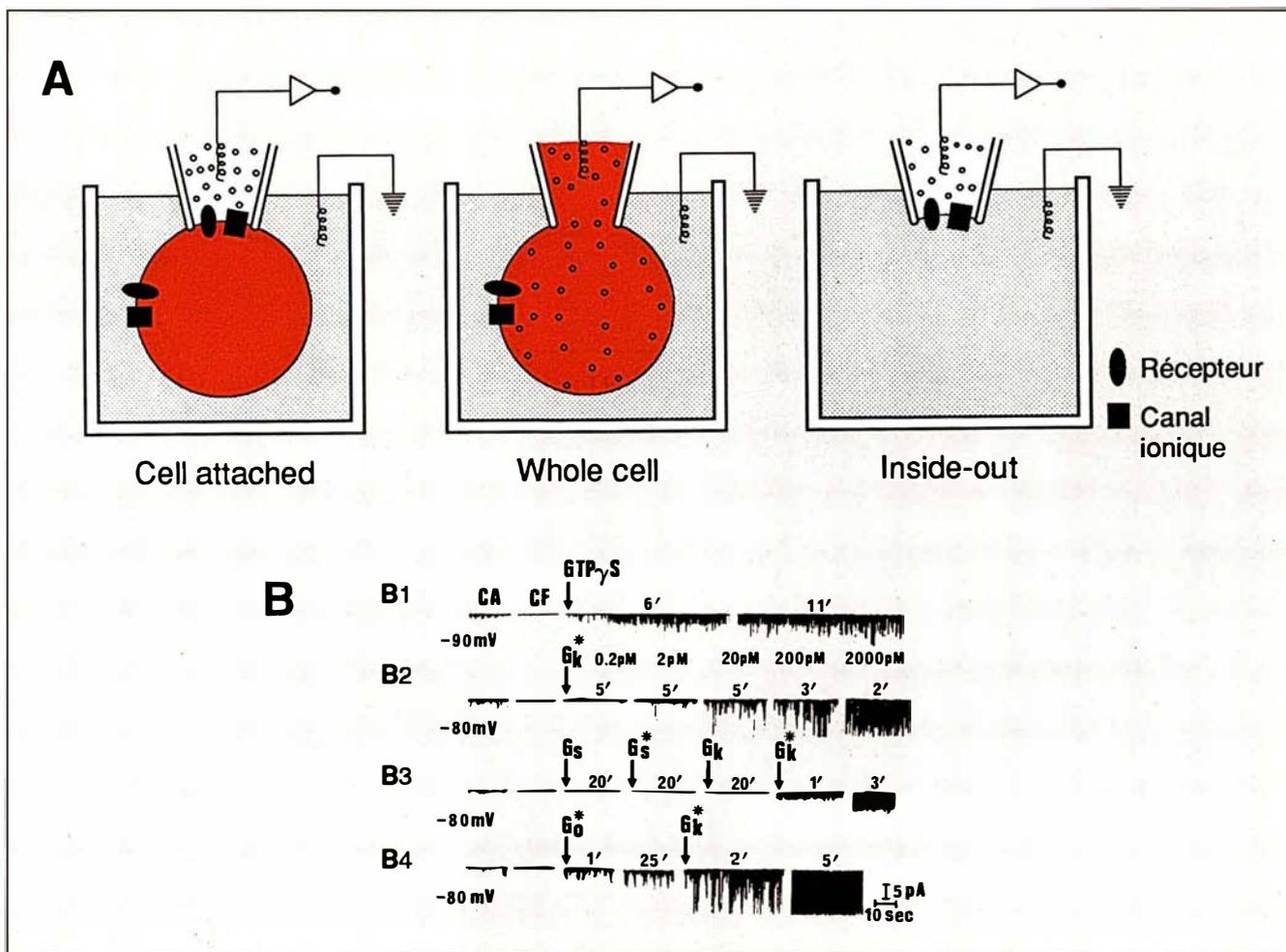


Figure 4. **Les différentes configurations utilisées dans la méthode de patch clamp pour étudier l'interaction des récepteurs avec les canaux ioniques (A). Contrôle des canaux K⁺ cardiaques par les protéines G étudié dans la configuration « inside out » (B). A. Cell attached** : la pipette de patch est déposée sur la cellule et la membrane cellulaire aspirée légèrement à l'intérieur de la pipette. On enregistre l'activité des canaux isolés dans ce fragment de membrane. **Whole cell** : la rupture de la membrane sous la pipette de patch de la configuration précédente conduit à la configuration « whole cell ». Il y a alors communication entre le milieu de la pipette et celui de la cellule dont on peut donc modifier la composition. On enregistre alors l'ensemble des courants de la cellule. **Inside out** : en soulevant la pipette en configuration « cell-attached », on peut arracher un fragment de membrane dont la surface interne est alors mise en contact avec le milieu ionique du bain. On peut avoir, dans ce fragment de membrane, des canaux seuls ou avec des récepteurs. **B.** Les canaux K⁺ de l'oreillette cardiaque sont étudiés dans la configuration « inside-out ». On rajoute alors dans le bain du GTP-γ-S (B1), différentes concentrations de protéine G_k (B2), G_s (B3) ou G_o (B4). Toutes ces protéines sont activées par le GTP-γ-S (astérisque) (d'après [20]).

mécanisme de contrôle des canaux ioniques par les protéines G est direct. Il a été tout récemment découvert (figure 2C). La protéine G, une fois activée par le récepteur, interagit directement avec le canal ionique, soit pour l'ouvrir, soit pour le fermer. Ici encore, le cœur a servi de modèle. La liaison de l'acétylcholine au récepteur muscarinique cardiaque active un canal K⁺ dit canal de rectification qui inhibe l'activité *pace-maker* cardiaque [19]. Lorsque l'activité des canaux K⁺ de ces cellules est

mesurée sous la pipette de patch dans la configuration *cell-attached* (figure 4A), l'acétylcholine n'a aucune action lorsqu'elle est appliquée à l'extérieur de la pipette, excluant un contrôle par production de seconds messagers [19]. Seule une application à l'intérieur de la pipette est efficace. Cela pouvait suggérer que ce récepteur est un récepteur-canal. Cependant, la mesure de l'activité de ces canaux selon la configuration *whole cell* (figure 4A), dans laquelle le milieu intracellulaire de

la cellule communique avec l'intérieur de la pipette, montre que si cette pipette ne contient pas de GTP, l'acétylcholine mise cette fois à l'extérieur de la cellule n'est pas capable d'activer les canaux K⁺ [19]. Le GTP-γ-S, un analogue non hydrolysable du GTP, mis dans la pipette est, lui, capable d'activer irréversiblement le canal K⁺. De plus, l'incubation des cellules cardiaques avec la PTx inhibe l'effet de l'acétylcholine [19]. Une protéine G est donc impliquée dans le couplage « récepteur musca-

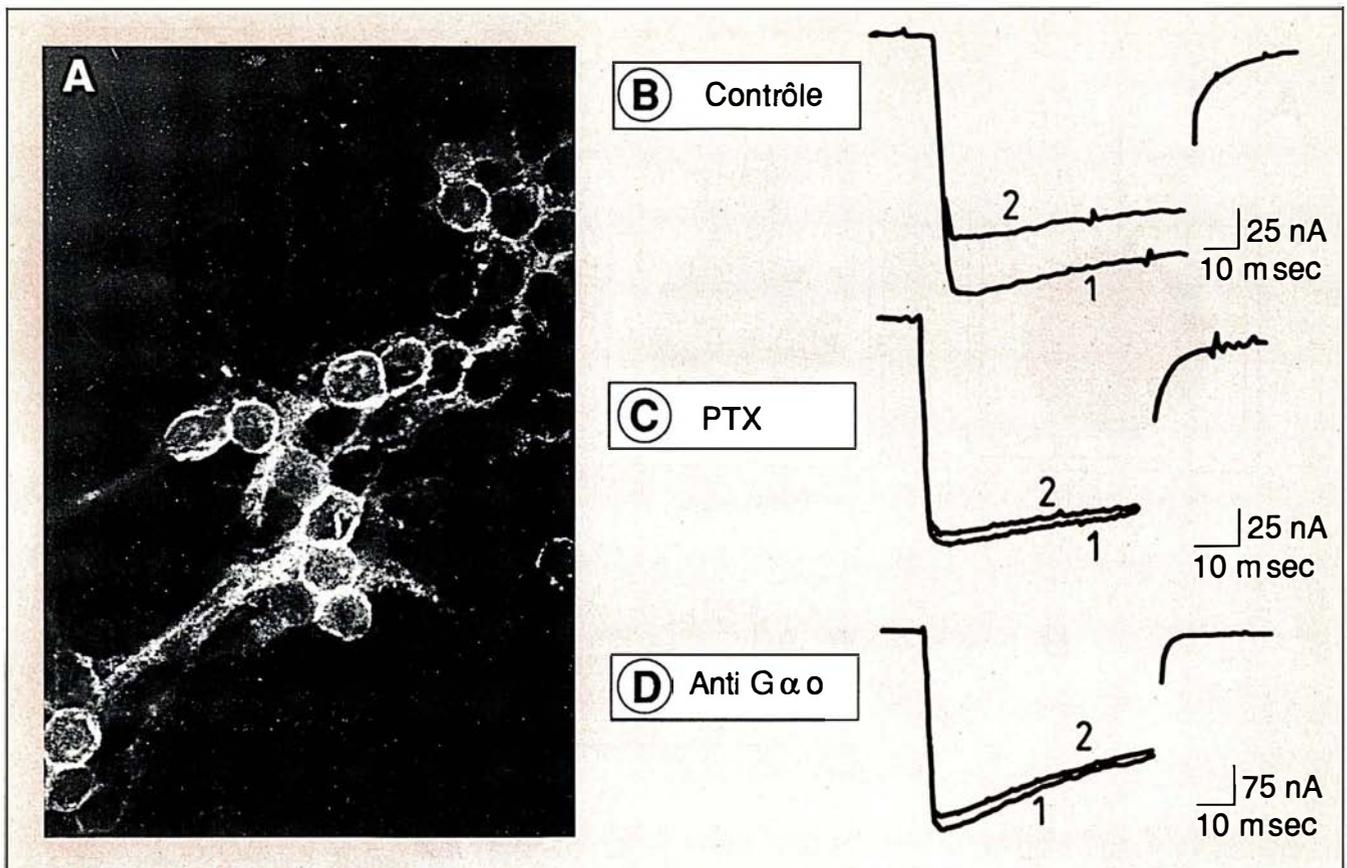


Figure 5. **La protéine G_o des cellules excitables inhibe des canaux Ca^{++} -voltage-dépendants.** **A.** La protéine G_o est détectée en immunofluorescence dans des neurones (granules) du cervelet ($\times 620$). La protéine G_o est particulièrement localisée au niveau des membranes et essentiellement au niveau des contacts cellulaires (d'après [4]). **B.** Courant passant par les canaux Ca^{++} -voltage-dépendants des neurones d'escargot [1] et sa réduction par la dopamine [2]. **C.** L'injection de la toxine de Bordetella pertussis (PTx), qui inactive les protéines G_o et G_i supprime, l'effet de la dopamine [1, 2]. **D.** L'injection de l'anticorps anti- $G_{\alpha o}$ supprime aussi l'effet de la dopamine (d'après [24]).

rinique-canal K^+ » du cœur sans qu'il soit nécessaire de produire un second messenger. La démonstration du couplage direct entre ces trois protéines est venue de l'utilisation de la technique *inside-out* (figure 4A). Sur des fragments de membrane isolés du milieu cytoplasmique, les équipes de A.M. Brown et L. Birnbaumer ont bien montré que: (1) le GTP- γ -S active les canaux K^+ ; (2) de très faibles concentrations (picomolaires) d'une protéine G, qu'ils ont appelé G_k , et qui se révèle être G_{i3} , active les canaux K^+ (figure 4B) [20].

La protéine G utilisée est activée par le GTP- γ -S et se trouve donc sous une forme dissociée, G_{α} -GTP- γ -S

plus $\beta\gamma$. Des concentrations mille fois plus fortes de G_{α} activée sont totalement inefficaces (figure 4B). G_{α} activée peut ouvrir ces canaux K^+ cardiaques, mais avec une activité 100 fois moindre que G_k . Notons qu'il est impossible d'exclure que dans un *patch* en configuration *inside-out* une ou plusieurs autres protéines intermédiaires puissent être mises en jeu entre la protéine G et le canal K^+ . La possibilité d'interactions complexes entre protéines au sein même d'un *patch inside-out* a été révélée très récemment. En effet, des concentrations nanomolaires de sous-unités $\beta\gamma$ peuvent aussi activer ce canal dans un *patch* en *inside-out* [2]. L'effet de $\beta\gamma$ sur le canal K^+

est complexe et semble se faire par l'intermédiaire de la production d'acide arachidonique et ses dérivés au sein même du *patch* [21]. L'acétylcholine n'emprunte cependant pas cette voie et son action se fait bien par l'intermédiaire de la sous-unité α de G_k [21].

Le couplage au sein même de la membrane entre le récepteur et le canal, par l'intermédiaire d'une protéine G et sans synthèse de seconds messagers, pourrait expliquer pourquoi la stimulation vagale produit des effets plus rapides sur le rythme cardiaque que la stimulation sympathique. Des expériences récentes ont montré qu'*in vitro*, non seulement G_k (G_{i3}) mais aussi G_{i1} et G_{i2} peuvent

activer le canal K^+ [22]. Ce résultat indique qu'une (ou plusieurs) sous-unité(s) $G_o\alpha$ est (sont) capable(s) à la fois d'activer le canal K^+ de rectification cardiaque, mais aussi d'inhiber l'adénylate cyclase. Cette notion nouvelle, selon laquelle une seule protéine G pourrait activer et/ou inhiber plusieurs effecteurs, commence à émerger. En effet, il a été aussi récemment démontré que G_s est capable non seulement d'activer l'adénylate cyclase, mais aussi d'augmenter directement l'activité de canaux Ca^{++} -voltage-dépendants incorporés dans une bicouche lipidique (*figure 3A*) [23]. Si les résultats de cette expérience pouvaient être extrapolés à ce qui se passe dans la cellule cardiaque, on aurait un double contrôle du canal Ca^{++} -voltage-dépendant, le premier indirect par l'AMPc *via* la kinase A, le deuxième direct *via* G_s (*figure 3B*). L'intérêt physiologique d'un double contrôle des canaux Ca^{++} par G_s n'est pas connu.

Nous venons de voir qu'une protéine G peut contrôler deux effecteurs différents, une enzyme et un canal ionique. La protéine G_o semble pouvoir contrôler deux canaux différents. En effet nous avons montré [24], en collaboration avec l'équipe de H. Gerschenfeld, qu'une protéine G reconnue par un anticorps spécifique dirigé contre $G_o\alpha$ couple de façon négative les récepteurs dopaminergiques de neurones d'escargots aux canaux Ca^{++} -voltage-dépendants. La PTx bloque ce couplage ainsi que l'injection d'anticorps anti- $G_o\alpha$ dans le neurone (*figure 5*) [24]. Une inhibition des canaux Ca^{++} par G_o a été également démontrée dans des neuroblastomes [26]. Plus récemment, il a été rapporté que G_o était aussi capable d'activer certains canaux K^+ des neurones de l'hippocampe (différents de ceux des cellules cardiaques) [25]. G_o pourrait donc activer des canaux K^+ et inhiber des canaux Ca^{++} . Cela est intéressant car une catégorie de neurotransmetteurs inhibiteurs comprenant les récepteurs dopaminergiques D_2 , les récepteurs des enképhalines, les récepteurs de la sérotonine de type 5-HT_{1A}, les récepteurs GABA B, les récepteurs de l'adénosine de type A_1 sont connus pour activer des canaux K^+ et inhiber des canaux Ca^{++} .

m/s n° 8 vol. 5, octobre 89

Conclusion

La découverte récente que les protéines G contrôlent non seulement la production de seconds messagers, mais aussi, directement, l'activité de canaux ioniques, souligne bien le principe général d'action de ces protéines : la liaison du GTP catalysée par des protéines chargées de reconnaître un message, est utilisée pour produire un changement de conformation des protéines G. L'évolution a utilisé ce changement de conformation d'une manière créative pour contrôler l'activité d'effecteurs variés. Il est possible que des effecteurs autres que des enzymes ou des canaux ioniques soient contrôlés par les protéines G. On peut penser aux protéines du cytosquelette, mais aussi aux séquences régulatrices de gènes. L'autre idée importante qui émerge est que les mécanismes de transduction d'un récepteur sont multiples. Le récepteur dopaminergique D_2 par l'intermédiaire d'une ou plusieurs protéines G, toutes sensibles à la PTx, inhibe l'adénylate cyclase, active un canal K^+ , inhibe certainement un canal Ca^{++} , inhibe la production d' IP_3 stimulée par d'autres récepteurs et, finalement, bloque directement l'étape finale d'exocytose [27]. Une protéine G ne contrôle pas simplement un effecteur, mais exécute un programme complexe de transductions. Cette diversité des programmes dépend de la nature, mais aussi de la stœchiométrie entre récepteurs, protéines G et effecteurs. Ceci explique probablement la diversité des modifications physiologiques qu'une hormone ou un neurotransmetteur peut produire selon la cellule considérée. Il faudra mettre en commun toutes les ressources techniques de la biologie moléculaire et cellulaire pour décoder ces programmes de transduction. Éléments clés de la transduction des signaux externes, les protéines G pourraient être à l'origine de nombreuses maladies. Une maladie génétique, le pseudo-hypoparathyroïdisme, est due à un défaut de G_s [28]. Un autre défaut de G_s a été mis en évidence dans des tumeurs hypophysaires [29]. G_s mutée serait-elle un oncogène ? ■

Summary

Regulation of ion channels by G-proteins

The G proteins (proteins which bind GTP) are a family of homologous proteins triggering the coupling of various membrane bound receptors to their cellular effectors. A few years ago, it was believed that G proteins only controlled the activity of enzymes which produce or degrade second messengers. Two years ago, it was found that these proteins are also able to couple directly receptors and ionic channels. The best known example is the coupling of muscarinic receptors to K^+ channels through a G protein called G_k . Following these studies, the notion appeared that a given receptor does not trigger its cellular action by modifying a single coupling mechanism, but by executing a complex program of transductions. What will be the next cellular function recognized to be controlled by G proteins? A role in the traffic of membrane bound proteins is likely. One can also think of a control of cytoskeletal protein functions and, why not, the modulation of gene expression?

TIRÉS A PART

J. Bockaert.