

## Les canaux potassiques inhibés par l'ATP cellulaire : une aventure physiologique à suspense moléculaire

La première indication que la perméabilité potassique membranaire des cellules musculaires était sensible aux fluctuations de leur niveau énergétique, est apparue en 1954, lorsque Trautwein *et al.* ont montré que l'épuisement du muscle cardiaque s'accompagnait d'une augmentation du flux potassique sortant des cellules [1]. Une telle conductance potassique membranaire n'a, cependant, été identifiée qu'en 1983 par Akinori Noma [2] qui montra l'existence d'un canal potassique ouvert par la diminution en adénosine-5'-triphosphate (ATP) cellulaire dans les myocytes cardiaques. Notre connaissance de ces canaux, communément appelés canaux potassiques sensibles à l'ATP que l'on abrège souvent par canaux  $K_{(ATP)}$ , s'est, depuis lors, largement développée et étendue à une grande variété de types cellulaires où ils règlent des fonctions distinctes [3] telles que la sécrétion d'hormones (l'insuline par les cellules  $\beta$ -pancréatiques, par exemple [4]), le tonus vasculaire [5, 6], l'excitabilité du muscle squelettique [7, 8], le contrôle de l'appétit au niveau hypothalamique [9], la maturation des ovocytes [10] ou le recyclage des ions  $K^+$  par l'épithélium rénal [11]. Leur contribution au flux potassique sortant des cellules qui caractérise la phase initiale de l'ischémie s'est révélée être de grande importance dans le cœur et le cerveau où ces canaux interviennent dans le mécanisme complexe de la protection tissulaire; leur activité réduit la sévérité des lésions ischémiques ou retarde la mort cellulaire [12-14]. A la diversité des fonctions cellulaires attribuées aux canaux  $K_{(ATP)}$  est associée la diversité de leurs propriétés électrophysio-

logiques et pharmacologiques [15, 16], suggérant que cette famille de canaux pourrait être constituée d'un assemblage hétérogène de protéines membranaires.

La caractéristique générale des canaux  $K_{(ATP)}$  est que l'ATP cytosolique exerce une double fonction: (1) celle de ligand, pour fermer le canal, et (2) celle de substrat enzymatique en la présence de magnésium ( $ATP-Mg^{2+}$ ), pour rendre le canal opérationnel (*figure 1*). Cette seconde action de l'ATP, assimilée à une phosphorylation du canal par l'hydrolyse de l'ATP en ADP, permet de restaurer les ouvertures spontanées du canal lorsque celui-ci n'est plus actif. La phosphorylation du canal n'est pas impliquée dans l'inhibition de son activité par l'ATP car les analogues non hydrolysables de l'ATP ont aussi une action inhibitrice. Il en est de même des autres nucléotides dont l'efficacité à fermer le canal est variable selon leur nature ( $ATP > ADP > AMP > CTP > GTP > UTP > ITP$ ) [17]. Cependant, les nucléosides diphosphates (NDP), comme l'ADP ou le GDP par exemple, sont également capables de contrecarrer l'effet inhibiteur de l'ATP, induisant ainsi l'ouverture du canal en dépit de la présence d'ATP intracellulaire [12, 17, 18]. Ainsi, le rapport des concentrations intracellulaires en ATP et NDP est considéré comme le principal régulateur de l'activité des canaux  $K_{(ATP)}$ . La modulation de l'activité des canaux par les nucléotides est, en fait, beaucoup plus complexe et partiellement comprise. De nombreux résultats expérimentaux ont montré que le mécanisme d'action des NDP dépend de l'état fonctionnel du canal et, en par-

ticulier, de son degré de phosphorylation [18]. La représentation schématique de la régulation du canal  $K_{(ATP)}$  cardiaque, proposée dans la *figure 1*, souligne cette relation et exclut une éventuelle compétition entre les nucléosides tri- et diphosphates sur un même site de fixation pour expliquer l'antagonisme de leurs effets. Cette régulation de l'activité du canal peut être modulée par divers facteurs (comme l'adénosine, l'acétylcholine) *via* l'activation d'un récepteur membranaire couplé à une protéine (G) fixant la guanosine triphosphate [19, 20]. Par ailleurs, les canaux  $K_{(ATP)}$  sont bloqués par les sulfonylurées antidiabétiques (glibenclamide, tolbutamide, par exemple) et sont activés par une classe de composés, appelés « ouvreurs potassiques » (cromakalim, levcromakalim, aprikalim, pinacidil, nicorandil...), avec une affinité variable selon les types cellulaires [12, 15, 16, 18]. La complexité de la régulation pharmacologique du canal  $K_{(ATP)}$  à laquelle on peut ajouter celle de la régulation endogène, rendait difficile la compréhension de son fonctionnement cellulaire.

Une meilleure compréhension de la régulation du canal  $K_{(ATP)}$  est devenue possible avec la caractérisation moléculaire de la protéine constitutive du canal. En 1995, Aguilar-Bryan *et al.* [21] réalisèrent le clonage et l'expression du gène codant pour le récepteur des sulfonylurées (SUR pour *sulphonylurea receptor*) qui appartient à la super-famille des protéines membranaires fixant l'ATP (protéines ABC pour *ATP-binding cassette*) (*m/s* n° 2, vol. 12, p. 251). La protéine SUR possède deux sites intracellulaires de fixation des nucléotides (*figure 2*), mais ne constitue pas par

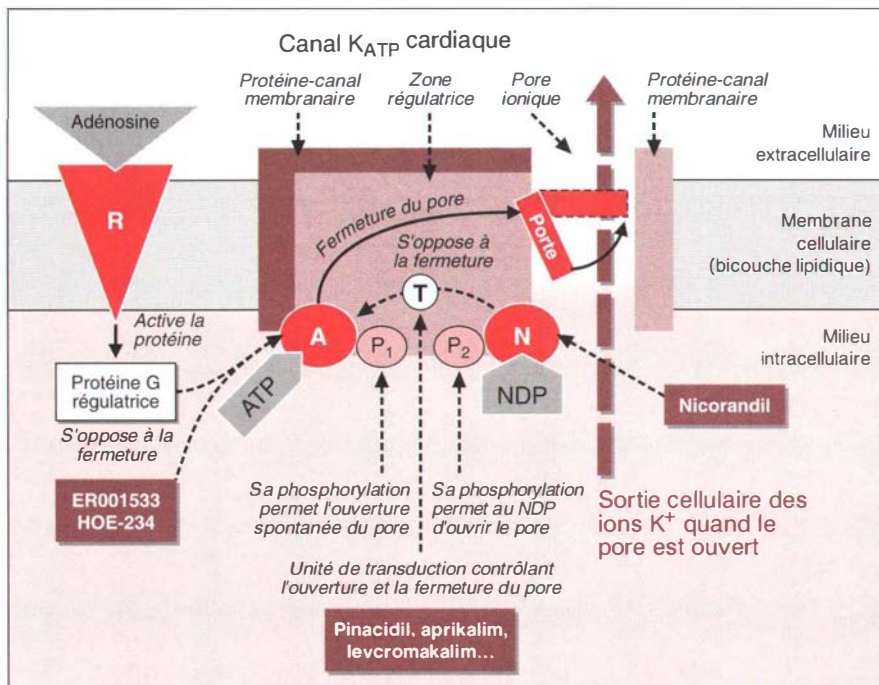


Figure 1. Représentation schématique de la régulation du canal  $K_{ATP}$  cardiaque par les nucléosides diphosphates (NDP) et les « ouvreurs » potassiques (potassium channel openers, PCO). Ce modèle hypothétique suppose que le canal  $K_{ATP}$  (et/ou les sous-unités qui lui sont associées) possède deux sites distincts, P1 et P2, réglés par une réaction enzymatique qui dépend de la présence d'ATP-Mg<sup>2+</sup> intracellulaire et peut être assimilée à une phosphorylation. Dans ce modèle, le canal doit être phosphorylé en P1 pour s'ouvrir spontanément en l'absence de nucléotide. La phosphorylation et la déphosphorylation de ce site seraient responsables de la perte progressive (run-down) et de la restauration de l'activité du canal. Quand le site P1 est déphosphorylé (run-down de l'activité spontanée), la fixation des NDP sur le site N induit l'ouverture du canal à condition que le site P2 soit phosphorylé. P2 doit être distinct de P1 pour expliquer comment l'activité induite par les NDP décline avec le temps et peut être relancée par l'ATP-Mg<sup>2+</sup> sans que l'activité spontanée du canal soit restaurée. La fixation de l'ATP sur le site A inhibe non seulement les ouvertures spontanées du canal, mais aussi l'activité induite par les NDP, indépendamment du site phosphorylé (P1 ou P2). Les NDP peuvent contrecarrer l'effet inhibiteur de l'ATP seulement si les deux sites P1 et P2 sont phosphorylés. Cette condition draconienne n'est, toutefois, pas applicable à tous les canaux  $K_{ATP}$  décrits dans les autres tissus. Les protéines G (sous-unité  $\alpha$  fixant le GTP) activent le canal en contrecarrant l'effet inhibiteur de l'ATP. La majorité des PCO (pinacidil, levcromakalim, aprikalim...) augmentent l'activité du canal, en la présence ou en l'absence d'ATP ou de NDP, en agissant sur une unité hypothétique de transmission T qui contrôle l'ouverture et la fermeture du canal (porte). Certains PCO (ER001533, HOE-234) agissent exclusivement en la présence d'ATP en contrecarrant son effet inhibiteur directement ou indirectement sur le site A, alors que d'autres PCO (nicorandil) semblent nécessiter la présence de NDP sur le site N ou un autre site pour augmenter l'activité du canal ou diminuer sa sensibilité à l'ATP (modifié de Terzic et al. [18]).

elle-même un canal ionique transmembranaire perméable aux ions  $K^+$ , contrairement à d'autres protéines ABC, par exemple de type CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance

regulator) formant un canal chlorure dont l'altération pathologique est responsable de la mucoviscidose. Les sous-unités définissant le pore du canal  $K_{ATP}$  ont, par ailleurs, été

identifiées la même année [22-24], et portent le cachet de la superfamille des canaux potassiques dits à rectification entrante (canaux Kir pour *inward rectifying K<sup>+</sup> channels*), caractérisés par deux segments transmembranaires hydrophobes reliés l'un à l'autre par une boucle H5 conférant au canal sa sélectivité pour les ions  $K^+$  (figure 2). Deux membres de cette superfamille, Kir 6.1 [23] et Kir 6.2 [22, 24] dont les séquences en acides aminés sont identiques à 70 %, seraient les principaux composants du canal  $K_{ATP}$ , caractérisé par un faible degré de rectification entrante. Ainsi, le canal  $K_{ATP}$  fonctionnel est un hétéromère, formé par l'assemblage du récepteur des sulfonylurées (SUR) et de sous-unités protéiques appartenant à la famille Kir [21, 22, 24-26]. Comment peut-on, dans ce contexte, expliquer la diversité fonctionnelle des canaux  $K_{ATP}$ , de grande spécificité tissulaire? Trois protéines SUR ont été, depuis, identifiées suivant le type cellulaire considéré : SUR1 dans le pancréas endocrine [22, 24], SUR2A dans le myocarde et le muscle squelettique [25, 26], et SUR2B dans le muscle lisse vasculaire [26]. Les protéines SUR2A et SUR2B sont des isoformes, codées par le même gène, qui ne diffèrent que par leur chaîne carboxy-terminale [26]. Associées aux sous-unités Kir 6.2, les protéines SUR (SUR1, 2A ou 2B) forment un canal doté des mêmes propriétés biophysiques mais dont la sensibilité aux nucléotides intracellulaires, aux sulfonylurées et aux « ouvreurs potassiques », diffère suivant la nature de la protéine SUR impliquée [22, 24-27]. Il semble que Kir 6.2 associée à SUR1 constitue le canal  $K_{ATP}$  des cellules  $\beta$  du pancréas endocrine [22, 24] (figure 2). En effet, les deux gènes codant respectivement pour Kir 6.2 et SUR1, sont fortement exprimés dans le pancréas [22]. De plus, leur co-expression dans les ovocytes de xénope donne naissance à des canaux qui présentent des propriétés très comparables à celles du canal  $K_{ATP}$  natif des cellules  $\beta$  pancréatiques [27]. Les canaux ainsi clonés, sont sélectifs des ions  $K^+$ , activés par le diazoxide et bloqués par l'ATP et les sulfonylurées antidiabétiques.



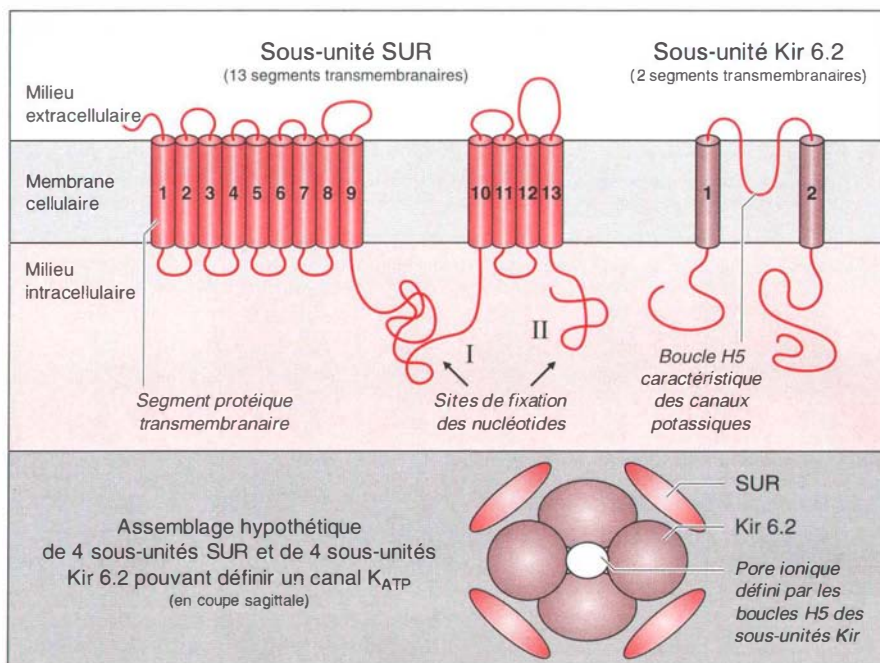


Figure 2. **Représentation hypothétique de la structure d'un canal  $K_{(ATP)}$  avec sa sous-unité Kir 6.2 et sa sous-unité SUR dont la nature peut varier d'un tissu à l'autre.** La protéine SUR est composée de 1 582 acides aminés organisés en 13 segments transmembranaires et possède 2 sites de fixation pour les nucléotides (I et II). L'extrémité aminée de la sous-unité SUR est extracellulaire, alors que son extrémité carboxylique est intracellulaire. Kir 6.2 est une protéine de 390 acides aminés organisée en 2 segments transmembranaires et possédant la structure H5 conservée des canaux potassiques. L'assemblage tétramérique des sous-unités Kir 6.2 auxquelles seraient associées les sous-unités SUR, pourrait définir un canal dont le pore central serait bordé par les segments H5 de Kir 6.2. (pancréas : SUR1 ; cœur : SUR2A ; vaisseaux : SUR2B).

En considérant la distribution tissulaire des protéines SUR, les canaux composés de Kir 6.2 et de SUR2A ou de SUR2B correspondraient aux canaux  $K_{(ATP)}$  natifs des myocytes cardiaques et vasculaires [24-26]. Cependant, le gène de Kir 6.2 ne semble pas être exprimé dans les cellules musculaires lisses vasculaires, contrairement à celui de Kir 6.1 [22, 23]. La co-expression des gènes de SUR2B et de Kir 6.1 donne aussi naissance à un canal potassique fonctionnel, de pharmacologie commune aux canaux  $K_{(ATP)}$  [28]. Ce canal possède, toutefois, des propriétés biophysiques et une régulation par les nucléotides très différentes de celles du canal composé de SUR2B et de Kir 6.2 [26], voire même des canaux  $K_{(ATP)}$  natifs du myocarde ventriculaire ou du pancréas endocrine. En

revanche, sa faible conductance unitaire, son activation plutôt que son inhibition par l'ATP intracellulaire et sa fermeture spontanée, lui confèrent une grande analogie avec un autre canal potassique, activé par les nucléosides diphosphates (canal  $K_{(NDP)}$ ) et décrit dans les cellules musculaires lisses vasculaires [28, 29]. De cette étude récente, il apparaît que les interactions exercées entre les sous-unités Kir et SUR peuvent avoir des conséquences déterminantes sur le fonctionnement du canal reconstitué et, en particulier, sur sa sensibilité aux nucléotides [28], indépendamment de la protéine SUR. Des études complémentaires sont donc nécessaires pour disséquer ces interactions dans les différentes combinaisons de sous-unités Kir et SUR, que l'on peut envisager pour expliquer la

diversité de cette classe de canaux de grande spécificité tissulaire.

Malgré les progrès considérables vers la connaissance du fonctionnement et de la régulation endogène des canaux  $K_{(ATP)}$ , leur rôle physiologique mais surtout leur degré d'implication dans de nombreuses affections commencent seulement à être élucidés. L'importance majeure de tels canaux dans la physiologie humaine, notamment comme candidat potentiel dans la protection cellulaire cardiaque et cérébrale, ouvre de nouvelles perspectives dans le domaine clinique. Par ailleurs, les données récentes de la biologie moléculaire révèlent l'importance des mutations du gène codant pour la protéine SUR1 du canal  $K_{(ATP)}$  des cellules  $\beta$ -pancréatiques, chez les diabétiques. Certaines mutations seraient, en effet, responsables de l'hypoglycémie hyperinsulinique infantile (*m/s n° 2, vol. 13, p. 273*) [30-32]. Cette maladie rare est une altération de l'homéostasie glucidique, qui se caractérise par une non-régulation de l'hypersécrétion d'insuline et, consécutivement, une hypoglycémie sévère (un niveau faible de sucre dans le sang). A l'échelle cellulaire, cette maladie se traduit par la perte de l'activité des canaux  $K_{(ATP)}$  des cellules  $\beta$ -pancréatiques, pouvant résulter, soit de leur absence dans la membrane cellulaire, soit de leur présence membranaire mais dans un état non fonctionnel. Dans la forme familiale de l'hypoglycémie hyperinsulinique infantile, les patients présentent des altérations structurales de la protéine SUR1, qui résultent de l'introduction prématurée d'un codon stop au niveau du gène, et conduisent à la perte d'une partie (ou de la totalité) du second site de fixation des nucléotides (site II, *figure 2*) [30-32]. La perte de ce domaine produit, en effet, une réduction marquée de l'activité des canaux  $K_{(ATP)}$ . Des polymorphismes du gène SUR1 pourraient aussi contribuer au diabète non insulino-dépendant et à l'obésité familiale [33, 34]. La caractérisation, non seulement de la structure moléculaire des sous-unités constitutives des canaux  $K_{(ATP)}$ , mais aussi de leurs interactions lorsqu'elles sont assemblées, permettra peut-être l'émergence de nouvelles thérapies ■

## RÉFÉRENCES

1. Trautwein W, Gottstein U, Dudel J. Der Aktionsstrom der Myokardfaser im Sauerstoffmangel. *Pflügers Arch* 1954; 260: 40-60.
2. Noma A. ATP-regulated K<sup>+</sup> channels in cardiac muscle. *Nature* 1983; 305: 147-8.
3. Ashcroft SJH, Ashcroft FM. Properties and functions of ATP-sensitive K<sup>+</sup>-channels. *Cell Signal* 1990; 2: 197-214.
4. Ashcroft SJF, Rorsman P. Electrophysiology of the pancreatic  $\beta$ -cells. *Prog Biophys Mol Biol* 1989; 54: 87-143.
5. Standen NB. Potassium channels, metabolism and muscle. *Exp Physiol* 1992; 77: 1-25.
6. Nelson MT. Ca<sup>2+</sup>-activated potassium channels and ATP-sensitive potassium channels as modulators of vascular tone. *Trends Cardiovasc Med* 1993; 3: 54-60.
7. Weik R, Neumcke B. ATP-sensitive potassium channels in adult mouse skeletal muscle: characterization of the ATP-binding site. *J Membr Biol* 1989; 110: 217-26.
8. Davies NW, Standen NB, Stanfield PR. ATP-dependent potassium channels of muscle cells: their properties, regulation, and possible functions. *J Bioenerg Biomembr* 1991; 23: 509-35.
9. Ashford ML, Boden PR, Treherne JM. Tolbutamide excites rat glucoreceptive ventromedial hypothalamic neurons by indirect inhibition of ATP-K<sup>+</sup> channels. *Br J Pharmacol* 1990; 101: 531-40.
10. Wibbrand F, Honoré E, Lazdunski M. Opening of glibenclamide-sensitive K<sup>+</sup> channels in follicular cells promotes *Xenopus* oocyte maturation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 5133-7.
11. Quast U. ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in the kidney. *Naunyn-Schiederberg's Arch Pharmacol* 1996; 354: 213-25.
12. Lazdunski M. ATP-sensitive potassium channels: an overview. *J Cardiovasc Pharmacol* 1994; 24: S1-5.
13. Escande D, Caverio I. K<sup>+</sup> channel openers and « natural » cardioprotection. *Trends Pharmacol Sci* 1992; 13: 269-72.
14. Grover GJ. Protective effects of ATP-sensitive potassium channel openers in models of myocardial ischemia. *Cardiovasc Res* 1994; 28: 778-82.
15. Longman SD, Hamilton TC. Potassium channel activator drugs: mechanism of action, pharmacological properties, and therapeutic potential. *Med Res Rev* 1992; 12: 73-148.
16. Edwards G, Weston AH. The pharmacology of ATP-sensitive potassium channels. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1993; 597-637.
17. Lederer WJ, Nichols CJ. Nucleotide modulation of the activity of rat heart ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in isolated membrane patches. *J Physiol* 1989; 419: 193-211.
18. Terzic A, Jahangir A, Kurachi Y. Cardiac ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels: regulation by intracellular nucleotides and K channel-opening drugs. *Am J Physiol* 1995; 269: C525-45.
19. De Weille JR, Schmid-Antomarchi H, Fosset M, Lazdunski M. Regulation of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in insulinoma cells. Activation by somatostatin and kinase C, the rôle of cAMP. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 2971-5.
20. Dunne MJ, Bullett MJ, Guodong L, Wollheim CB, Petersen OH. Galanin activates nucleotide-dependent K<sup>+</sup> channels in insulin-secreting cells *via* a pertussis toxin-sensitive G-protein. *EMBO J* 1989; 8: 413-20.
21. Aguilar-Bryan L, Nichols CG, Wechsler SW, Clément JP, Boyd AE, Gonzalez G, Herrera-Sosa H, Nguy K, Bryan J, Nelson DA. Cloning of  $\beta$ -cell high-affinity sulfonylurea receptor: a regulator of insulin secretion. *Science* 1995; 268: 423-9.
22. Inagaki N, Gonoi T, Clément JP, Namba N, Inazawa J, Gonzalez G, Aguilar-Bryan L, Seino S, Bryan J. Reconstitution of IK<sub>(ATP)</sub>: an inward rectifier subunit plus the sulfonylurea receptor. *Science* 1995; 270: 1166-70.
23. Inagaki N, Tsuura Y, Namba N, Masuda K, Gonoi T, Horie M, Seino Y, Mizuta M, Seino S. Cloning and functional characterization of a novel ATP-sensitive potassium channel ubiquitously expressed in rat tissues, including pancreatic islets, pituitary, skeletal muscle and heart. *J Biol Chem* 1995; 270: 5691-4.
24. Sakura H, Ammala C, Smith PA, Gribble FM, Ashcroft FM. Cloning and functional expression of the cDNA encoding a novel ATP-sensitive potassium channel subunit expressed in pancreatic  $\beta$ -cells, brain, heart and skeletal muscle. *FEBS Lett* 1995; 377: 338-44.
25. Inagaki N, Gonoi T, Clément JP, Wang CZ, Aguilar-Bryan L, Bryan J, Seino S. A family of sulfonylurea receptors determines the pharmacological properties of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels. *Neuron* 1996; 16: 1011-7.
26. Isomoto C, Kondo M, Yamada S, Matsumoto O, Higashiguchi Y, Horio Y, Matuzawa Y, Kurachi Y. A novel sulfonylurea receptor forms with BIR (Kir 6.2) a smooth muscle type ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel. *J Biol Chem* 1996; 40: 24321-4.
27. Gribble FM, Ashfield R, Ammala C, Ashcroft FM. Properties of cloned ATP-sensitive K<sup>+</sup> currents expressed in *Xenopus* oocytes. *J Physiol* 1997; 498: 87-98.
28. Yamada M, Isomoto S, Matsumoto S, Kondo C, Shindo T, Horio Y, Kurachi Y. Sulfonylurea receptor 2B and Kir 6.1 form a sulfonylurea-sensitive but ATP-insensitive K<sup>+</sup> channel. *J Physiol* 1997; 499: 715-20.
29. Zhang HL, Bolton TB. Two types of ATP-sensitive potassium channels in rat portal vein smooth muscle cells. *Br J Pharmacol* 1996; 118: 105-14.
30. Thomas PM, Wohllk N, Huang E, Kuhnle U, Rabl W, Gagel RF, Cote GJ. Inactivation of the first nucleotide-binding fold of the sulfonylurea receptor, and familial persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy. *Am J Hum Genet* 1996; 59: 510-8.
31. Kane C, Shepherd RM, Squires PE, Johnson PRV, James RFL, Milla PJ, Aynsley-Green A, Lindley KJ, Dunne MJ. Loss of functional K<sub>(ATP)</sub> channels in pancreatic  $\beta$ -cells causes persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy. *Nature Med* 1996; 2: 1344-7.
32. Dunne MJ, Kane C, Shepherd RM, Sanchez JA, James RFL, Johnson PRV, Aynsley-Green A, Lu S, Clément JP, Lindley KJ, Seino S, Aguilar-Bryan L. Familial persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy and mutations in the sulfonylurea receptor. *N Engl J Med* 1997; 336: 703-6.
33. Inoue H, Ferrer J, Welling CM, Elbein SC, Hoffman M, Mayorga R, Warren-Perry M, Zhang Y, Millns H, Turner R, Province M, Bryan J, Permutt MA, Aguilar-Bryan L. Sequence variants in the sulfonylurea receptor (SUR) gene are associated with NIDDM in Caucasians. *Diabetes* 1996; 45: 825-31.
34. Hani EH, Clément K, Velho G, Vionnet N, Hager J, Philippi A, Dina C, Inoue H, Permutt A, Basdevant A, North M, Demenais F, Guy-Grand B, Froguel P. Genetic studies of the sulfonylurea receptor gene locus in NIDDM and in morbid obesity among french Caucasians. *Diabetes* 1997; 46: 688-94.

### Dominique Thuringer

Laboratoire de physiologie des cellules cardiaques et vasculaires, Cnrs UMR 6542, Université de Tours, Faculté des sciences, Parc de Grandmont, 37200 Tours, France.

### Icilio Caverio

Rhône-Poulenc Rorer, Centre de recherche de Vitry-Alfortville, 13, quai Jules-Guesde, BP 14, 94403 Vitry-sur-Seine Cedex, France.

### TIRÉS À PART

I. Caverio.