

L'échange Na/Ca

André Herchuelz
Françoise Van Eylen
Philippe Lebrun

Parmi les nombreux mécanismes qui participent au contrôle de la concentration calcique cellulaire, l'échange Na/Ca joue un rôle souvent sous-estimé. Cependant, le clonage des gènes codant pour ses isoformes cardiaque, rénale et neuronale, a beaucoup stimulé l'étude de la fonction de l'échangeur Na/K. Cet échangeur est électrogénique et sensible au potentiel membranaire. Son activité dépend du pH et des concentrations intracellulaires en ATP et en Ca^{2+} . Au niveau myocardique, l'échange Na/Ca est responsable de la quasi-totalité de la sortie de Ca^{2+} durant la diastole et pourrait aussi permettre l'entrée du Ca^{2+} durant la systole. Dans les autres tissus, le rôle de l'échangeur Na/K reste moins connu, quoique les progrès soient, ici aussi, rapides.

Le calcium (Ca^{2+}) joue un rôle important de second messager intracellulaire dans de nombreux processus physiologiques. Pour que ce rôle puisse s'exercer, la concentration cytoplasmique de l'ion doit être contrôlée de façon précise. Les systèmes responsables de ce contrôle sont nombreux et incluent notamment des canaux calciques membranaires, des ATPases localisées à divers niveaux (membrane cellulaire, réticulum endoplasmique, mitochondries) et des échangeurs, tel l'échange sodium/calcium (Na/Ca) de la membrane cellulaire. L'échange Na/Ca est, comme son nom l'indique, un processus transportant du sodium (Na^+) en échange de calcium (Ca^{2+}). Il en existe deux types, l'un mitochondrial et l'autre localisé au niveau de la membrane cytoplasmique. C'est ce dernier que nous considérerons en priorité dans cette revue. L'échange Na/Ca est un système unique permettant l'expulsion du Ca^{2+} de la cellule contre son gradient de concentration sans consommer d'énergie (figure 1). En effet, c'est

l'entrée de Na^+ dans la cellule, selon un gradient électro-chimique favorable, qui fournit l'énergie au transport du Ca^{2+} . L'échange est par ailleurs réversible et peut aussi permettre l'entrée de Ca^{2+} dans la cellule en échange du sodium sortant (mode inversé; figure 1). L'intérêt des scientifiques pour ce système s'est beaucoup accru ces dernières années, non seulement en raison de la mise en évidence du rôle majeur joué par l'échangeur dans l'expulsion du Ca^{2+} de la cellule cardiaque, mais également à la suite du clonage de l'échangeur dans différents tissus et chez diverses espèces. Ces dernières années, deux symposiums internationaux ont été consacrés à ce sujet [1, 2].

Les observations initiales compatibles avec l'existence d'un échange Na/Ca datent de plus d'un siècle et furent réalisées par Ringer. Cependant, ce sont les travaux de Reuter et Seitz et de Baker et Blaustein à la fin des années 1960 qui définirent les caractéristiques principales de l'échangeur et ouvrirent un domaine de recherche qui n'a plus cessé depuis de

ADRESSE

A. Herchuelz : *professeur ordinaire*. F. Van Eylen : *attributaire d'une bourse du Fonds national de la recherche scientifique (FNRS)*. P. Lebrun : *maître de recherches du FNRS*. Laboratoire de pharmacodynamique et de thérapeutique, faculté de médecine, université libre de Bruxelles route de Lennik 808, Bâtiment GE, B-1070 Bruxelles, Belgique.

TIRÉS À PART

A. Herchuelz.

croître (pour revue, voir [3]). A cet égard, il est important de noter que l'échange Na/Ca fut le premier mécanisme d'expulsion du Ca^{2+} à avoir été mis en évidence dans les tissus excitablement électriquement, et ce, longtemps avant la Ca^{2+} -ATPase. La façon la plus simple de mettre en évidence un échange Na/Ca au niveau cellulaire est d'étudier l'effet de la réduction de la concentration extracellulaire de Na^+ (par exemple de 140 mM à 0 mM) sur la sortie ou l'entrée de ^{45}Ca (reflet indirect des mouvements de ^{40}Ca) dans la cellule. L'étude de l'effet de la réduction de la concentration extracellulaire de Na^+ sur le flux sortant de ^{45}Ca de cellules chargées en ^{45}Ca permet de mettre en évidence et d'étudier l'échange Na/Ca fonctionnant selon son mode flux sortant de Ca^{2+} (mode normal, *forward mode*; figure 2A). Inversement, l'étude de cette même réduction de la concentration extracellulaire de Na^+ sur la capture de ^{45}Ca par les cellules permet de mettre en évidence et d'étudier l'échange Na/Ca dans son mode flux entrant de Ca^{2+} (mode inversé; *reverse mode*; figure 2B). Les ions substitués au Na^+ sont la choline, le lithium, le saccharose et la N-méthylglucamine. Ces substituants n'entrent pas dans la cellule par des voies empruntées par le Na^+ . Un effet ne peut être attribué à la réduction de la concentration extracellulaire de Na^+ que lorsqu'un effet identique est observé en utilisant chacun des 3 ou 4 substituants. Pour étudier l'échange Na/Ca, on peut également mesurer les modifications de la concentration cytosolique de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) ou du potentiel membranaire d'une cellule en réponse à des modifications d'activité de l'échange Na/Ca (figures 2C et 2D). A l'issue d'assez nombreux travaux, un consensus est établi pour penser que la stoechiométrie de l'échange est de trois ions Na^+ entrants pour un ion Ca^{2+} sortant [3]. En d'autres termes, la stoechiométrie du transporteur comporte un nombre inégal de charges menant à la production d'un courant électrique net. Une autre conséquence est la sensibilité de l'échangeur au potentiel membranaire. En mode normal, l'échangeur engendre un courant entrant, rendant plus positif l'intérieur de la cellule; en mode inversé, l'échangeur engendre un cou-

rant sortant, rendant ainsi plus négatif l'intérieur de la cellule (figure 3 et figure 2D). Le potentiel d'inversion de l'échangeur est de l'ordre de -40 mV. A ce potentiel de membrane, l'échangeur s'arrête (état de flux nul). Au-delà de cette valeur, le courant s'inverse. Ainsi, le potentiel de membrane influence le sens du fonctionnement de l'échangeur, puisque les potentiels de membrane plus négatifs que -40 mV favorisent le mode normal, alors que les potentiels plus positifs favorisent le mode inversé. Le rôle primordial attribué à l'échangeur est celui d'expulser du Ca^{2+} de la cellule. Cela fut initialement démontré dans le muscle cardiaque et dans l'axone géant de calmar et, ultérieurement, dans un nombre important de tissus [3]. Dans la cellule β pancréatique, nous avons démontré que divers produits libérant du Ca^{2+} à partir des organites intracellulaires provoquaient une augmentation plus importante de la concentration du Ca^{2+} cytosolique ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) lorsque l'échange Na/Ca était inhibé, par exemple en l'absence de Na^+ extracellulaire [4]. Puisqu'une plus forte augmentation de la concentration de Ca^{2+} intracellulaire allait de pair avec une moindre sortie de Ca^{2+} de la cellule, nos résultats ont permis de démontrer que l'échange Na/Ca représentait un mécanisme d'expulsion du Ca^{2+} de la cellule β . Dans la cellule β pancréatique et dans de nombreux autres types cellulaires, l'échange Na/Ca assure le retour rapide à la normale de la concentration cytosolique de Ca^{2+} , à la suite d'une entrée massive de l'ion dans la cellule ou à la suite d'une libération de l'ion provenant des organites intracellulaires (par exemple, le réticulum endoplasmique). L'échange Na/Ca ne représente pas le seul mécanisme susceptible de ramener la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ à sa valeur de repos. D'autres mécanismes sont susceptibles de contribuer à cet effet: (1) les diverses Ca^{2+} -ATPases qui peuvent transporter le Ca^{2+} à l'intérieur du réticulum endoplasmique et des mitochondries et (2) la Ca^{2+} -ATPase de la membrane cellulaire qui rejette le Ca^{2+} vers l'extérieur de la cellule. Il est admis que la Ca^{2+} -ATPase de la membrane cellulaire présente une forte affinité et une faible capacité pour le transport du Ca^{2+} [5]. A l'inverse, il a été proposé que l'échange

Na/Ca avait une faible affinité mais une forte capacité [5]. Il est généralement admis que l'échange Na/Ca assure le contrôle des modifications importantes de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, alors que la Ca^{2+} -ATPase assure un contrôle plus fin autour de la concentration cytosolique basale (100 nM). A la lumière de données récentes, il apparaît que cette vision n'est sans doute pas généralisable à tous les tissus et que la situation doit être examinée dans le cas de chaque type cellulaire. Dans une série d'investigations, Bers et Bridge ont déterminé la contribution respective de divers systèmes de transport au contrôle de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ dans la cellule musculaire cardiaque [6]. Ces auteurs ont étudié la cinétique de la relaxation musculaire du muscle ventriculaire de lapin en réponse à une contracture induite par un refroidissement et un réchauffe-

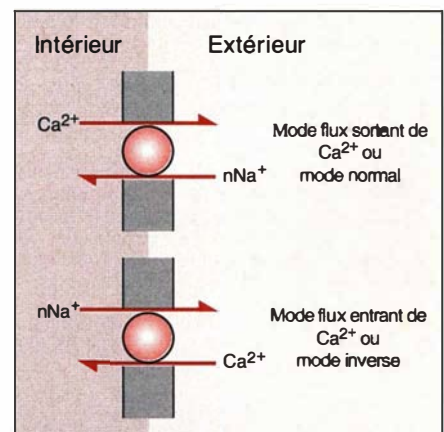


Figure 1. Modes de fonctionnement de l'échange Na/Ca. En mode normal (flux sortant de Ca^{2+}), l'entrée du Na^+ dans la cellule selon son gradient de concentration fournit l'énergie à la sortie du Ca^{2+} contre son gradient de concentration. Les concentrations intra- et extracellulaires de Na^+ sont respectivement de ± 10 mM et de 140 mM. Le gradient de concentration de Na^+ est assuré par la Na^+/K^+ ATPase qui expulse le Na^+ de la cellule. Les concentrations intra- et extracellulaires de Ca^{2+} sont respectivement de 100 nM et de 1 mM. En mode inversé, l'échangeur permet l'entrée de Ca^{2+} dans la cellule en échange du Na^+ sortant. Pour que l'échangeur fonctionne selon ce mode, une inversion du gradient électrochimique du Na^+ est requise (voir dans le texte). n = nombre (de Na^+ transporté = 3).

RÉFÉRENCES

1. Allen TJA, Noble D, Reuter H. *Sodium-calcium exchange*. Oxford : Oxford Science Publications, 1989 : 1-332.
2. Blaustein MP, DiPolo R, Reeves JP. Sodium-calcium exchange. *Ann NY Acad Sci* 1991 ; 639 : 1-671.
3. Sheu SS, Blaustein MP. Sodium/calcium exchange and control of cell calcium and contractility in cardiac and vascular smooth muscles. In : Fozzard HA, et al, eds. *The heart and the cardiovascular system*. New York : Raven Press Ltd, 1992 : 903-43.
4. Herchuelz A, Plasman PO. Sodium-calcium exchange in the pancreatic B cell. *Ann NY Acad Sci* 1991 ; 639 : 642-56.
5. Carafoli E. Membrane transport of calcium : an overview. *Methods Enzymol* 1988 ; 157 : 3-11.
6. Bers DM. Species differences and the role of sodium-calcium exchange in cardiac muscle relaxation. *Ann NY Acad Sci* 1991 ; 639 : 375-85.
7. Leblanc N, Hume JR. Sodium current-induced release of calcium from cardiac sarcoplasmic reticulum. *Science* 1990 ; 248 : 372-6.
8. DiPolo R, Beaugé L. Ca^{2+} transport in nerve fibers. *Biochim Biophys Acta* 1988 ; 947 : 549-69.
9. Philipson KD, Nicoll DA. Molecular and kinetic aspects of sodium-calcium exchange. *Int Rev Cytol* 1993 ; 137C : 199-227.
10. Hilgemann DW, Collins A, Cash DP, Nagel GA. Cardiac $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ exchange system in giant membrane patches. *Ann NY Acad Sci* 1991 ; 639 : 26-139.
11. Doering AE, Lederer WJ. The mechanism by which cytoplasmic protons inhibit the sodium-calcium exchanger in guinea-pig heart cells. *J Physiol* 1993 ; 466 : 481-99.

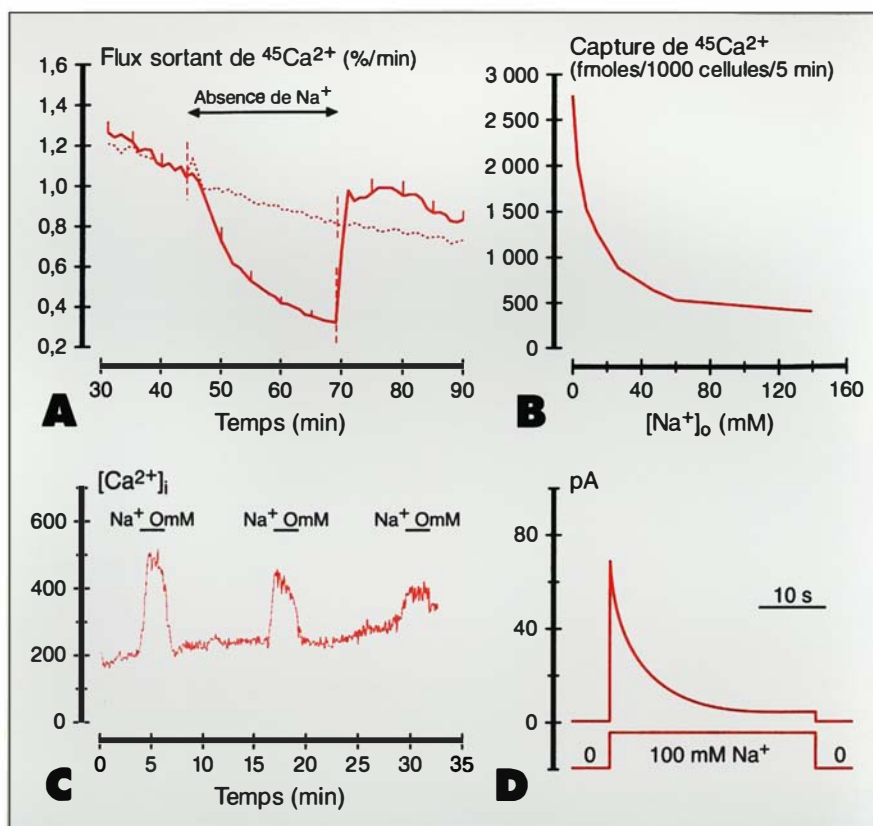


Figure 2. **A.** Effet de l'absence de Na^+ extracellulaire sur le flux sortant de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ d'îlots pancréatiques chargés en $^{45}\text{Ca}^{2+}$. Le Na^+ a été remplacé par du saccharose. L'absence de Na^+ extracellulaire entraîne une chute rapide du flux sortant de $^{45}\text{Ca}^{2+}$, le phénomène étant réversible lors du retour à un milieu extracellulaire ayant une concentration normale de Na^+ . Le tracé en pointillé représente une expérience témoin au cours de laquelle la concentration extracellulaire de Na^+ n'a pas été modifiée. **B.** Effet de la concentration extracellulaire de Na^+ sur la capture de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ par des cellules B pancréatiques. La diminution de la concentration de Na^+ entraîne une stimulation dépendante de la dose (inverse) de la capture de $^{45}\text{Ca}^{2+}$. **C.** Effet de 3 diminutions brutales de la concentration extracellulaire de Na^+ de 140 mM à 0 mM sur la concentration cytoplasmique de Ca^{2+} d'une cellule β pancréatique isolée. Le passage à une solution dépourvue de Na^+ entraîne une augmentation rapide de la concentration cytoplasmique de Ca^{2+} , le phénomène étant réversible. La concentration de Ca^{2+} a été mesurée à l'aide du marqueur fluorescent Fura 2 et d'un système microfluorimétrique. **D.** Courant sortant engendré par l'échange Na/Ca fonctionnant en mode inversé et mesuré par méthode de voltage imposé sur fragment géant de membrane cardiaque de cobaye. Le courant sortant (indiqué par la positivité de la déflexion) est activé par l'addition de 100 mM de Na^+ à la face cytoplasmique du fragment de membrane. La concentration cytoplasmique de Ca^{2+} est de 2 μM . La concentration extracellulaire de Na^+ et de Ca^{2+} est respectivement de 0 mM et de 5 mM. Le courant est exprimé en picoampères (pA). (D'après [28].)

ment rapide du muscle. La contraction est induite par une libération intracellulaire de Ca^{2+} entraînant une augmentation de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ et la relaxation résulte du retour de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ vers le niveau basal. Lorsque l'échange Na/Ca est bloqué (en absence de Na^+ extracellulaire), la relaxation est ralentie de 30 %. Lorsque l'accumulation de Ca^{2+} dans le réticulum sarcoplasmique est prévenue par l'adjonction de caféine, la relaxation est ralentie de 70 %. Lorsque ces deux systèmes sont inhibés, la relaxation est pratiquement abolie. Cela indique que seuls ces deux processus contribuent à la relaxation de la fibre myocardique, le réticulum sarcoplasmique à concurrence de 70 % et l'échange Na/Ca de la membrane cellulaire à concurrence de 30 %. Ces données montrent également que l'accumulation de Ca^{2+} au niveau des mitochondries et l'élimination de Ca^{2+} via la Ca^{2+} -ATPase membranaire sont des processus trop lents pour rendre compte de la relaxation musculaire cardiaque [6]. D'autres études conduites par ces mêmes auteurs démontrèrent que le flux sortant de Ca^{2+} durant la diastole pouvait être attribué principalement à l'échange Na/Ca, la Ca^{2+} -ATPase membranaire ne contribuant que fort peu à l'expulsion de Ca^{2+} (même lorsque l'échange Na/Ca était bloqué). Actuellement, des données aussi pré-

cises ne sont disponibles que pour le tissu cardiaque et quelques autres tissus et la contribution de l'échange Na/Ca à l'expulsion du Ca^{2+} de la plupart des cellules reste à déterminer. Cependant, les données de la littérature indiquent que l'échange Na/Ca pourrait ne pas jouer un rôle aussi important dans tous les types cellulaires. Durant la systole, l'échange Na/Ca pourrait en outre permettre l'entrée de Ca^{2+} dans la cellule [3, 6, 7]. En effet, le potentiel de membrane devient plus positif que le potentiel d'équilibre de l'échangeur, de sorte qu'il existe durant la systole une force motrice favorisant l'entrée de Ca^{2+} via l'échangeur. A l'inverse, durant la diastole, l'extrusion de Ca^{2+} par l'échange Na/Ca est favorisée sur le plan thermodynamique car le potentiel de membrane est plus négatif que le potentiel d'inversion de l'échange, ce qui favorise un courant entrant. Divers facteurs sont susceptibles de moduler l'activité de l'échangeur, dont les concentrations ioniques de part et d'autre de la membrane. Les $K_{1/2}^*$ d'activation ou d'inhibition du Na^+ et du Ca^{2+} sont présentés dans la figure 4 [8, 9]. Notons tout particulièrement dans le mode flux sortant de Ca^{2+} , le $K_{1/2}$ inhibiteur du Na^+ intracellulaire (20 – 30 mM) et le $K_{1/2}$ activateur du Ca^{2+} intracellulaire (1 μM). Le $K_{1/2}$ du Ca^{2+} au site transporteur intracellai-

re (mode flux sortant de Ca^{2+}) peut varier d'un tissu à l'autre et d'une situation à l'autre. Signalons, en outre, l'existence d'un site régulateur calcique localisé à la face interne de la membrane, activateur de l'échange en mode inversé. La valeur du $K_{1/2}$ du Ca^{2+} à ce site est variable également (50 nM à 1 μM). Cet effet activateur peut paraître paradoxal. En mode inversé, on attendrait plutôt une inhibition par le $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Signalons qu'une exposition de la face interne de la membrane à de la chymotrypsine convertit le transporteur en son état activé et supprime donc l'effet activateur du $[\text{Ca}^{2+}]_i$ [10]. La signification de ce site régulateur calcique n'est pas entièrement élucidée. Dans le cœur, l'entrée de Ca^{2+} au travers des canaux calciques pourrait activer l'échangeur et favoriser l'entrée de Ca^{2+} via l'échangeur durant la systole. Au cours de la diastole, en revanche, le site régulateur pourrait éviter que l'échangeur n'abaisse la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de façon excessive [9].

Un autre facteur régulateur de l'échange Na/Ca est le potentiel membranaire, un phénomène qui a été discuté en détail plus haut. Rappelons ici la valeur du potentiel d'inversion de l'échangeur qui est de l'ordre de -40 mV , mais cette valeur peut varier d'une cellule à l'autre et d'un moment à l'autre dans une même cellule car ce potentiel d'inversion dépend des concentrations de Na^+ et de Ca^{2+} de part et d'autre de la membrane. Bien que les concentrations extracellulaires varient peu durant l'activité cellulaire, les concentrations intracellulaires peuvent se modifier. Le pH intracellulaire (pH_i) affecte également l'échange Na/Ca, le pH acide inhibant l'échangeur et le pH alcalin le stimulant [3, 8].

Au pH intracellulaire physiologique (pH 6,9), l'échangeur est en état de relative inhibition [11]. Une inhibition complète peut être obtenue à un pH intracellulaire de 6 et une stimulation de plus de 200 % à pH 8. Un traitement par la chymotrypsine de l'intérieur de la membrane supprime l'effet inhibiteur du pH acide et convertit l'échangeur en son état ac-

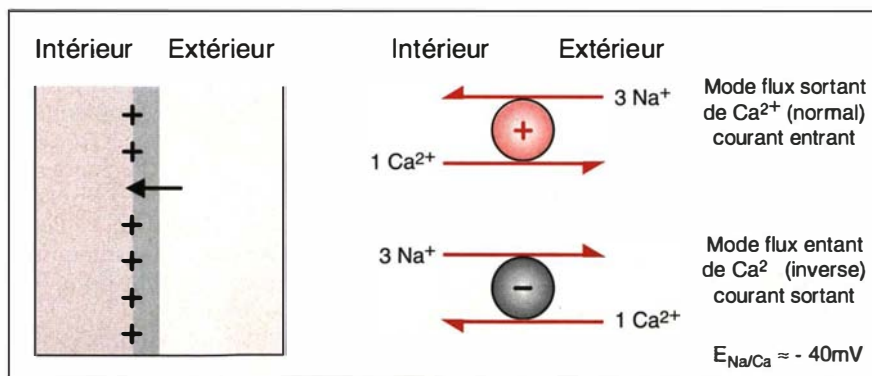


Figure 3. **Courants engendrés par l'échange Na/Ca.** En mode normal, l'entrée de 3 charges positives (3Na^+) en échange de 2 charges positives (1Ca^{2+}) engendrent un courant entrant. En mode inversé, un courant sortant sera produit (voir aussi figure 2D). La cellule est représentée schématiquement par un bain séparé en 2 compartiments par une membrane semi-perméable. Le compartiment gauche représente le milieu intracellulaire, le compartiment droit représente le milieu extracellulaire. La flèche indique l'existence d'un courant entrant avec accumulation de charges positives à l'intérieur de la cellule résultant du fonctionnement de l'échangeur en mode normal. Le potentiel d'inversion (reversal potential) de l'échangeur Na/Ca est de l'ordre de -40 mV .

* $K_{1/2}$ = concentration à laquelle l'ion exerce une action positive ou négative valant 50 % de l'effet maximal.

RÉFÉRENCES

12. Caroni P, Carafoli E. The regulation of the $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ exchanger of heart sarcolemma. *Eur J Biochem* 1983 ; 132 : 451-60.
13. Hilgemann DW, Collins A. Mechanism of cardiac $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ exchange current stimulation by MgATP : possible involvement of aminophospholipid translocase. *J Physiol* 1992 ; 454 : 59-82.
14. Nicoll DA, Longoni S, Philipson D. Molecular cloning and functional expression of the cardiac sarcolemmal $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ exchanger. *Science* 1990 ; 250 : 562-5.
15. Reeves JP. Molecular aspects of sodium-calcium exchange. *Arch Biochem Biophys* 1992 ; 292 : 329-34.
16. Li Z, Nicoll DA, Collins A, Hilgemann DW, Filoteo AG, Penniston JT, Weiss JN, Tomisch JM, Philipson KD. Identification of a peptide inhibitor of the cardiac sarcolemmal $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ exchanger. *J Biol Chem* 1991 ; 266 : 1014-20.
17. Hryshko LV, Nicoll DA, Weiss JN, Philipson KD. Biosynthesis and initial processing of the cardiac sarcolemmal $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ exchanger. *Biochim Biophys Acta* 1993 ; 1151 : 35-42.
18. Matsuoka S, Nicoll DA, Reilly RF, Hilgemann DW, Philipson KD. Initial localization of regulatory regions of the cardiac sarcolemmal $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ exchanger. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993 ; 90 : 3870-4.
19. Achilles A, Friedel U, Haase W, Reiländer H, Cook NJ. Biochemical and molecular characterization of the sodium-calcium exchanger from bovine rod photoreceptors. *Ann NY Acad Sci* 1991 ; 639 : 234-44.
20. Cervetto L, Lagnado L, Perry RJ, Robinson DW, McNaughton PA. Extrusion of calcium from rod outer segments is driven by both sodium and potassium gradients. *Nature* 1989 ; 337 : 740-3.
21. Kimura M, Aviv A, Reeves JP. K^+ -dependent $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ exchange in human platelets. *J Biol Chem* 1993 ; 268 : 6874-7.

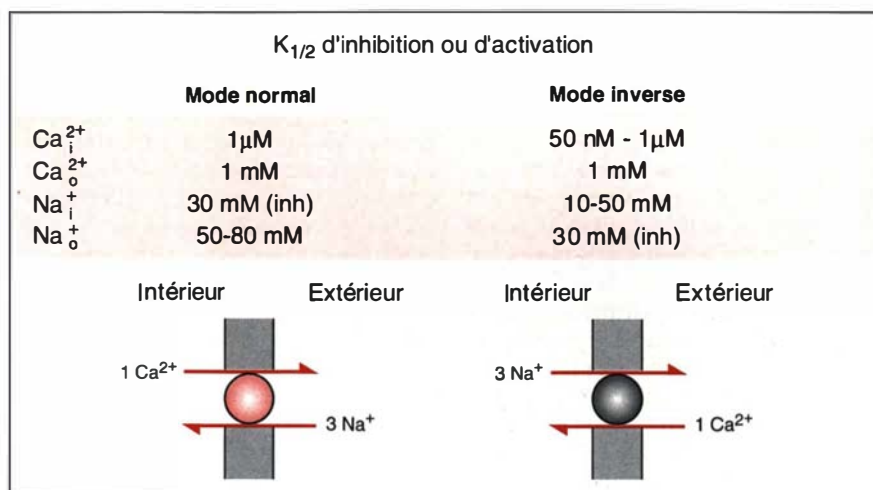


Figure 4. **Effets de la $[\text{Na}^+]$ et de la $[\text{Ca}^{2+}]$ sur l'échange Na/Ca .** Ca_i^{2+} et Na_i^+ : concentrations intracellulaires en Ca^{2+} et Na^+ . Ca_o^{2+} et Na_o^+ : concentrations extracellulaires en Ca^{2+} et Na^+ . Inh : $K_{1/2}$ inhibiteur. En l'absence d'indication, les valeurs sont celles des $K_{1/2}$ activateurs. Il faut remarquer que le Ca^{2+} intracellulaire est activateur même en situation inverse du fait de sa liaison au site régulateur calcique localisé à la face cytoplasmique de la membrane.

tivé [11]. Bien qu'il ait été signalé au début de ce chapitre que l'échangeur ne consommait pas d'énergie, l'ATP active l'échange Na/Ca sans être toutefois essentiel à son fonctionnement. Les données disponibles suggèrent que l'ATP agit en phosphorylant l'échangeur [8]. Dans les vésicules cardiaques, il a été proposé que la phosphorylation était relayée par une protéine kinase dépendante de la calmoduline [12]. Il a également été suggéré qu'une modification de l'environnement lipidique de l'échangeur (peut-être via une amino-phospholipide translocase) était impliquée dans l'effet de l'ATP [13]. Comme celui du pH et de $[\text{Ca}^{2+}]_i$, l'effet de l'ATP est supprimé par un bref traitement à la chymotrypsine qui convertit l'échangeur dans son état activé [10]. L'échangeur du cœur du chien fut initialement purifié, son gène cloné et séquencé [14]. La protéine déduite est composée de 970 acides aminés dont les 32 premiers résidus au niveau de l'extrémité N-terminale correspondent à une séquence signal. Cette séquence est probablement extracellulaire et apparaît étonnante dans le cas de cette protéine. La protéine comporte onze segments hydrophobes (à l'exclusion de la séquence signal) que l'on suppose transmembranaires. Il semble exister un large domaine intracytoplasmique de 520 acides aminés. Les

bras joignant les domaines transmembranaires sont courts et une portion faible de l'échangeur est exposée à l'extérieur (figure 5) [9, 15]. Les gènes codant pour les échangeurs des cœurs bovin et humain, du rein de lapin et du cerveau de rat ont également été clonés. Les échangeurs présentent une similitude de séquence très élevée (94 % à 96 %). Par hybridation *in situ*, l'échangeur a également été repéré dans le muscle lisse, le muscle squelettique, le foie, le pancréas, le placenta et le poumon. La protéine présente peu d'analogies de structure avec d'autres protéines, à l'exception d'une courte séquence sur laquelle nous reviendrons. La topologie de l'échangeur ressemble à certains égards à diverses ATPases qui présentent deux régions de 5 à 6 domaines transmembranaires de chaque côté d'un domaine intracytoplasmique large [9, 15]. Une zone de 20 acides aminés localisée au début de la boucle cytoplasmique (côté N-terminal) est constituée d'un mélange d'acides aminés basiques et hydrophobes rappelant le site de liaison de la calmoduline à différentes enzymes dépendantes de la calmoduline. Le peptide correspondant à cette zone a été synthétisé. Il lie la calmoduline et inhibe l'échange Na/Ca [16]. Le peptide de 20 acides aminés a été appelé XIP (*exchange inhibitory peptide*). Ce qui est

étrange, c'est que la calmoduline n'affecte pas l'échangeur. On imagine que cette zone de 20 acides aminés puisse interagir avec un segment acide de l'extrémité C-terminale de la boucle et inhiber ainsi l'échangeur. Il existe une courte région d'analogie (9 acides aminés) entre l'échangeur et diverses ATPases, par exemple la Na^+/K^+ ATPase et les Ca^{2+} -ATPases du réticulum sarcoplasmique et de la membrane cellulaire. Les différences sont faibles, mais la séquence a la même localisation sur le dernier segment N-terminal précédant le domaine cytoplasmique. Par ailleurs, un résidu glutamique est un des acides aminés essentiels à la liaison du Ca^{2+} à la Ca^{2+} -ATPase du réticulum sarcoplasmique du muscle strié. On peut dès lors imaginer que ce résidu est également essentiel à la liaison et/ou au transport du Na^+ ou du Ca^{2+} dans le cas de l'échangeur [9, 15]. La localisation par des techniques de biologie moléculaire des zones régulatrices de l'échangeur

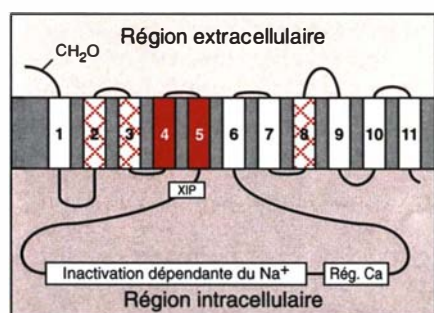


Figure 5. Représentation graphique de l'échangeur Na/Ca cardiaque. Il paraît comporter onze segments transmembranaires, un site de glycosylation (CH_2O) près de l'extrémité amino-terminale et une grande boucle hydrophile intracytoplasmique localisée entre les segments transmembranaires 5 et 6. Sont indiqués en rouge hachuré les segments 2, 3 et 8 qui présentent une similitude avec les segments homologues de l'échangeur Na/Ca des bâtonnets rétiniens et, en rouge, les segments 4 et 5 qui présentent une similitude avec les segments homologues de la pompe Na^+/K^+ . La localisation du site de liaison de type calmoduline (XIP), du site présumé d'inactivation par le Na^+ et d'activation par le Ca^{2+} sont aussi indiqués. La partie amino-terminale est située à gauche de la molécule, la partie carboxy-terminale à droite. (Dessiné d'après [29].)

vient à peine de débiter [9, 17, 18]. Les études réalisées jusqu'à présent ont démontré les faits suivants (figure 5) : (1) l'échangeur est glycosylé en position 9 et cette glycosylation n'affecte pas l'activité de l'échangeur, (2) le site de liaison du XIP sur la boucle intracytoplasmique a été confirmé, (3) deux autres sites régulateurs sont localisés sur cette boucle : un site d'inactivation par le Na^+ intracellulaire et un site d'activation par le Ca^{2+} . Il existe un échangeur qui présente des différences importantes avec l'échangeur cardiaque ; il s'agit de l'échangeur du segment externe des bâtonnets rétiniens [19]. La protéine s'avère notablement glycosylée et seules deux zones de 60 acides aminés ont une analogie avec l'échangeur cardiaque et l'échangeur rétinien. Ces segments sont localisés dans les deux domaines transmembranaires situés de part et d'autre de la boucle cytoplasmique. Signalons ici que le segment analogue au transporteur cardiaque qui existe dans la Na^+/K^+ ATPase ne se retrouve pas dans l'échangeur des bâtonnets rétiniens. Les échangeurs cardiaques et rétiniens présentent cependant une ressemblance sur le plan topologique. En effet, l'échangeur rétinien présente également une boucle cytoplasmique mais il comporte 6 domaines transmembranaires de chaque côté avec un domaine supplémentaire par rapport à l'échangeur cardiaque au niveau terminal. La région N-terminale forme aussi un domaine extracellulaire plus important [9, 15]. A cette différence entre les deux types d'échangeurs, correspond également une différence d'activité physiologique. En effet, l'échangeur des bâtonnets rétiniens présente la particularité de transporter du Na^+ en échange non seulement du Ca^{2+} mais également du K^+ . La stœchiométrie est de 4 Na^+ pour 1 Ca^{2+} + 1 K^+ . Le nombre de charges transportées étant asymétrique, le système est lui aussi électrogénique [20]. Le système assure à nouveau l'expulsion du Ca^{2+} de la cellule mais le transport de K^+ avec le Ca^{2+} , favorisé par le gradient électrochimique du K^+ , pourrait permettre une réduction plus importante de la concentration cytosolique de Ca^{2+} (jusqu'aux environs de 1 nM [20]). Le seul autre tissu dans lequel un échangeur pré-

sentant un fonctionnement de type rétinien ait été observé est la plaquette sanguine [21]. Les mitochondries présentent également un échange Na/Ca mais la stœchiométrie de l'échange est de 2 Na^+ pour 1 Ca^{2+} et le transporteur n'est donc pas électrogénique [22]. Au niveau mitochondrial, il constitue un système de flux sortant de Ca^{2+} et joue un rôle dans les relais des modifications de concentration de Ca^{2+} cytosolique au niveau de la matrice des mitochondries où le Ca^{2+} contrôle des enzymes clés affectant la production d'ATP [23]. Le progrès de nos connaissances concernant l'échange Na/Ca a été freiné et est toujours freiné par l'absence d'inhibiteurs spécifiques. Il existe pourtant diverses substances qui inhibent l'échangeur [24]. Parmi les produits inorganiques, le lanthane est l'inhibiteur le plus puissant de l'échangeur mais il inhibe également d'innombrables autres mouvements ioniques. Parmi les produits organiques, signalons tout d'abord l'amiloride et ses dérivés substitués au niveau de la fonction guanidine. L'amiloride, un diurétique épargnant potassique, est un inhibiteur faible de l'échange Na/Ca . Les dérivés dichlorobenzamil et naphthylméthylamil sont environ 100 fois plus puissants mais pas plus spécifiques. Ils sont en réalité des inhibiteurs plus puissants des canaux calciques dépendants du voltage que de l'échange Na/Ca [25]. Le bepridil est un autre inhibiteur connu de l'échangeur, mais le produit inhibe également les canaux calciques [24]. Tout récemment, il a été démontré que la naloxone à concentration millimolaire inhibait l'échange Na/Ca [26]. De même, des dérivés du térapeptide FMRFamide, qui présentent une action de type naloxone, se sont avérés inhiber complètement l'échange Na/Ca de microvésicules cardiaques [27]. Leur activité dans des cellules intactes reste à démontrer mais ces substances pêchent elles aussi par leur manque de spécificité car d'autres actions leur sont dès à présent reconnues. Elles sont néanmoins intéressantes et pourront peut-être s'avérer utiles à l'identification des sites transporteurs et régulateurs de l'échange Na/Ca . L'échange Na/Ca représente donc un système de transport original dont on commence seulement à mesurer

l'importance en physiologie. Les avancées récentes dans le domaine de la biologie moléculaire de l'échangeur permettront certainement des percées marquantes dans les années à venir. Elles faciliteront sans doute la mise au point d'inhibiteurs spécifiques de l'échange Na/Ca qui, à leur tour, nous permettront de mieux caractériser l'échangeur et de définir son rôle en physiologie cellulaire. Ces produits pourraient aussi représenter des agents d'intérêt thérapeutique non négligeable dans diverses sphères pharmacologiques, notamment cardiovasculaire ■

ADDENDUM

Depuis la rédaction de cet article, un travail a démontré l'existence de deux isoformes de l'échangeur (NCX1 et NCX2) [30]. NCX1 est l'isoforme cardiaque, NCX2 l'isoforme neuronale. Les gènes de ces deux isoformes présentent 65 % de similitude et sont localisés respectivement sur les chromosomes 2 et 14. Il existe, de plus, six sous-isoformes de NCX1 (NaCa1, NaCa2...), résultats d'un épissage alternatif [31]

RÉFÉRENCES

22. Li W, Shariat-Madar Z, Powers M, Sun X, Lanes RD, Garlid KD. Reconstitution, identification, purification, and immunological characterization of the 110-kDa Na⁺/Ca²⁺ antiporter from beef heart mitochondria. *J Biol Chem* 1992 ; 267 : 17983-9.
23. Cox DA, Matlib MA. A role for the mitochondrial Na⁺-Ca²⁺ exchanger in the regulation of oxidative phosphorylation in isolated heart mitochondria. *J Biol Chem* 1993 ; 268 : 938-47.
24. Kaczorowski GJ, Garcia ML, King VF, Slaughter RS. Development of inhibitors of sodium, calcium exchange. In : Baker PF, ed. *Handbook of experimental pharmacology. Calcium in drug actions*. Berlin : Springer-Verlag, 1988 ; 83 : 163-83.
25. Garcia ML, King VF, Shevell JL, Slaughter RS, Suarez-Kurtz G, Winquist RJ, Kaczorowski GJ. Amiloride analogs inhibit L-type calcium channels and display calcium entry blocker activity. *J Biol Chem* 1990 ; 265 : 3763-71.
26. Khananshvil D, Sarne Y. The effect of opiate agonists and antagonists on Na⁺-Ca²⁺ exchange in cardiac sarcolemmal vesicles. *Life Sci* 1992 ; 51 : 275-83.
27. Khananshvil D, Price DC, Greenberg MJ, Sarne Y. Phe-Met-Arg-Phe-NH₂ (FMR-Fa)-related peptides inhibit Na⁺-Ca²⁺ exchange in cardiac sarcolemmal vesicles. *J Biol Chem* 1993 ; 268 : 200-5.
28. Hilgeman D. Steady-state and dynamic properties of cardiac sodium-calcium exchange. *J Gen Physiol* 1992 ; 100 : 905-32.
29. Philipson KD, Nicoll DA, Li Z. *Molecular biology and function of carrier proteins*. The Rockefeller University Press, 1993 : 187-91.
30. Li Z, Matsuoka S, Hryshko LV, Nicoll DA, Bersohn EP, Burka MM, Lifton RP, Philipson KD. Cloning of the NCX2 isoform of the plasma membrane Na⁺-Ca²⁺ exchanger. *J Biol Chem* 1994 ; 269 : 17434-9.
31. Kofugi P, Lederer WD, Schulze DH. Mutually exclusive and cassette exons underlie alternatively spliced isoforms of the Na/Ca exchanger. *J Biol Chem* 1994 ; 269 : 5145-9.

Summary

Na/Ca exchange

Calcium (Ca²⁺) plays an important second messenger role in a large number of cells. To allow such a role, the cytosolic free Ca²⁺ concentration ([Ca²⁺]_i) must be tightly controlled. Several transport mechanisms participate in this control, including Ca²⁺ channels, Ca²⁺-ATPases and the Na/Ca exchange located at the plasma membrane. Na/Ca exchange allows Ca²⁺ extrusion from cells in exchange with Na⁺, the electro-chemical gradient of Na⁺ providing the energy for Ca²⁺ extrusion against its electrochemical gradient. This transporter is reversible and may allow Ca²⁺ entry in exchange with intracellular Na⁺. Initially identified in heart cells and in the squid giant axon about 30 years ago, the exchanger has been found in many other cells including the pancreatic β -cell that we have mainly investigated. Renewed interest for Na/Ca exchange comes from recent major advances in the molecular biology of the exchanger and the identification of its role in certain cells such as heart cells. The exchanger was recently cloned in the heart, the kidney and the brain. The deduced protein is composed of about 940 aminoacids and the different exchangers so far cloned display a high homology. The protein displays 11 transmembrane segments and a large intracytoplasmic domain of 520 aminoacids. Site di-

rected mutagenesis has recently started and the identification of the regulatory domains of the protein is ongoing, so that major progress in our knowledge of the exchanger are foreseeable in the near future. In heart cells, the process was shown to be responsible for almost the totality of Ca²⁺ extrusion and to regulate [Ca²⁺]_i on a beat-to-beat basis. The exact contribution of Na/Ca exchange to Ca²⁺ extrusion, although known in a few types of cells, remains to be determined in many others. In heart cells, the exchanger may also reverse during heart cycle and hence allow Ca²⁺ entry during systole. The process displays a stoichiometry of 3 Na⁺ for 1 Ca²⁺, is electrogenic and sensitive to membrane potential. It is activated by intracellular Ca²⁺, intracellular pH and ATP. One exchanger presenting large differences with the cardiac exchanger is the exchanger of the retinal rod outer segment. This process transports K⁺ in addition to Na⁺ and Ca²⁺ with a stoichiometry of 4 Na⁺ for 1 Ca²⁺ + 1 K⁺ and displays low homology with the cardiac exchanger. Presently, there are no specific inhibitors of the exchanger but the recent progresses made in molecular biology may allow to model such drugs that may be of great value in further studies of the role played by Na/Ca exchange in physiology and perhaps also pathology.