

## Glycoprotéines Rh humaines et transport d'ammonium : un premier lien expérimental

Les antigènes du groupe sanguin Rhésus (Rh) ont une importance cruciale en médecine transfusionnelle, du fait de leur forte immunogénicité, et c'est particulièrement vrai de celle de l'antigène RhD. Cependant, alors que leur implication dans la maladie hémolytique du nouveau-né est connue depuis soixante ans, la fonction biologique de ces protéines demeure toujours inconnue. Les antigènes Rh (D, Cc, Ee) seraient exprimés à la surface des hématies sous forme d'un complexe membranaire, constitué par l'association des protéines Rh (D et CE) avec plusieurs glycoprotéines (RhAG, *Rh associated glycoprotein*; LW; GPB, glycoporphine B, CD47) [1]. Si la spécificité antigénique Rh est déterminée par les deux gènes *RH* (*D* et *CE*), l'expression des antigènes nécessite également la présence de la glycoprotéine RhAG [2]. Ainsi, chez l'homme, l'absence de RhAG entraîne celle de tous les antigènes Rh à la surface des hématies (phénotype Rh<sub>nu</sub>), avec pour conséquence des anomalies morphologiques et fonctionnelles des érythrocytes [3]. La glycoprotéine RhAG semble donc indispensable à l'assemblage ou au transport du complexe à la surface cellulaire. *RH* et *RHAG* font partie de la même famille génique, et ils proviennent probablement de la duplication d'un gène *RHAG* ancestral, intervenue il y a environ 350 millions d'années. Les deux gènes ont alors évolué indépendamment à des vitesses différentes [4, 5].

Le séquençage systématique d'EST (*expressed sequence tag*) humains a récemment permis de mettre en évidence l'existence de nouveaux membres de la famille génique *RH*. Outre les gènes de spécificité érythroïde *RH* et *RHAG*,

celle-ci comprend également les gènes *RHGK* (aussi appelé *RHCG*), exprimé principalement dans le rein [6, 7], et *RHBG*, exprimé dans le rein, le foie et la peau [8].

Une analyse plus approfondie des séquences protéiques des membres de la famille a dévoilé une homologie inattendue entre la glycoprotéine RhAG et la famille des transporteurs d'ammonium Mep/Amt [9] (*figure 1*), des transporteurs décrits dans tous les domaines du vivant, excepté chez les vertébrés. Cette observation nous a menés, en collaboration avec Bruno André et Anne-Marie Marini, de l'Université Libre de Bruxelles, à réaliser une analyse fonctionnelle des glycoprotéines Rh, par complémentarité d'une souche de levure déficiente en transport d'ammonium. Il existe chez *S. cerevisiae* trois transporteurs d'ammonium Mep1, Mep2 et Mep3, qui permettent à la levure de croître dans un milieu contenant, comme seule source d'azote, de l'ammonium, présent à des concentrations faibles (0,1-1 mM NH<sub>4</sub><sup>+</sup>).

Parallèlement à leur rôle de transporteur de NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, les protéines Mep sont capables, au cours de la croissance cellulaire, de retenir des ions NH<sub>4</sub><sup>+</sup> provenant d'une autre source d'azote [10]. La souche mutante triple-*mepΔ*, dont les 3 gènes *mep* sont délétés, ne possède aucune de ces caractéristiques physiologiques : elle n'est pas capable de croître sur un milieu contenant de l'ammonium comme seule source d'azote, si les concentrations de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> sont inférieures à 5 mM [10]. Nous avons montré que la complémentation de la souche mutante triple-*mepΔ* par les glycoprotéines RhAG ou RhGK humaines permet à la cellule de se multiplier en milieu ammonium même si les concentrations de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> sont comprises entre 1 et 3 mM [6]. Cette complémentation n'est que partielle, mais le transport observé semble être spécifique des ions ammonium. En effet, l'expression des glycoprotéines RhAG et RhGK dans des souches de levure déficientes pour le transport de K<sup>+</sup> ou le

MEP1 (173..198)	..DWAGGGNIEILSAVSGFVYSWFLGKR..
MEP3 (172..197)	..DWAGGGNIEILSAVAGFVYSYFLGRR..
MEP2 (186..211)	..DYAGGLCVHLTSGHGGLVYALILGKR..
RHBG (178..203)	..DAGGSMTIHTFGAYFGLVLSRVLYRP..
RHGK (177..202)	..DAGGSMTIHTFGAYFGLTVTRILYRR..
RHAG (167..192)	..DIGASMTIHAFGAYFGLAVAGILYRS..
<b>Consensus</b>	<b>..DFAGGTVVHIFGGYAGLAAAYVLGKR..</b>

Figure 1. Alignement des trois protéines Mep de levure (MEP1, MEP2, MEP3) et des glycoprotéines Rh humaines (RhAG, RHGK, RHBG). La région de la protéine alignée (26 acides aminés) correspond à la signature des transporteurs d'ammonium (PROSITE : PS01219). La séquence consensus est extraite de la base de données ProDom (domaine : PD001450) (<http://www.toulouse.inra.fr.html>). La position des acides aminés dans chaque protéine est indiquée entre parenthèses.

transport d'acides aminés, ne permet pas de restaurer la croissance des cellules mutantes. Les glycoprotéines Rh sont donc capables de transporter l'ammonium du milieu extérieur vers le milieu intracellulaire. En outre, elles sont également capables d'excréter les ions ammonium. En effet, les tests de croissance effectués sur un milieu contenant du méthylammonium (un analogue de l'ammonium) et les expériences d'efflux de  $\text{NH}_4^+$  indiquent qu'elles ont aussi cette capacité. Si la croissance des souches sauvages et triple-*mep* $\Delta$  est bloquée par de fortes concentrations de méthylammonium, toxique pour la cellule, les souches triple-*mep* $\Delta$  exprimant RhAG ou RhGK se multiplient, ce qui suggère que ces deux glycoprotéines exportent le méthylammonium. Enfin, si les conditions de culture sont modifiées afin que la seule source endogène de  $\text{NH}_4^+$  soit issue du catabolisme de l'arginine présent dans le milieu de culture, la quantité de  $\text{NH}_4^+$  excrétée dans le milieu est nettement plus importante lorsque les cellules triple-*mep* $\Delta$  expriment RhAG et RhGK.

Ainsi, ces résultats établissent pour la première fois un lien direct entre le transport d'ammonium et les glycoprotéines Rh. Or, jusqu'à présent, aucun transporteur spécifique des ions  $\text{NH}_4^+$  n'a été caractérisé chez les

mammifères. L'hypothèse d'un rôle physiologique des protéines Rh dans le transport de l'ammonium est par ailleurs attrayante, si l'on considère la spécificité de l'expression tissulaire (érythroïde, hépatique et rénale) des trois gènes correspondants et le rôle physiologique de ces tissus dans la régulation de l'ammonium. En effet, si la concentration d'ammonium dans le sang est faible (environ 50  $\mu\text{M}$ ), elle est trois fois plus importante dans les érythrocytes que dans le plasma. L'ammonium issu de la dégradation des acides aminés alimentaires est métabolisé dans le foie. La synthèse hépatique d'urée permet de maintenir une concentration d'ammonium plasmatique faible. Le rein joue un rôle essentiel dans l'homéostasie de l'état acide/base puisqu'une partie des acides fixes est éliminée dans l'urine sous forme d'ammonium. Le maintien strict du pH sanguin, comme de la concentration circulante d'ammonium, nécessite probablement la présence de transporteurs spécifiques, en particulier au niveau des membranes des cellules hépatiques et rénales. Ce rôle pourrait-il être rempli par les glycoprotéines Rh? Nos résultats ouvrent la voie à de nouvelles études concernant les mécanismes moléculaires du transport d'ammonium, sa régulation et plus largement son rôle physiologique.

1. Cartron JP. RH blood group system and molecular basis of Rh-deficiency. *Baillière's Clin Haematol* 1999; 12: 655-89.
2. Chérif-Zahar B, Raynal V, Gane P, et al. Candidate gene acting as a suppressor of the RH locus in most cases of Rh-deficiency. *Nat Genet* 1996; 12: 168-73.
3. Schmidt PJ, Vos GH. Multiple phenotypic abnormalities associated with Rh-null<sup>-/-</sup>. *Vox Sang* 1967; 13: 18-20.
4. Kitano T, Sumiyama K, Shiroishi T, Saitou N. Conserved evolution of the Rh50 gene compared to its homologous Rh blood group gene. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 249: 78-85.
5. Matassi G, Chérif-Zahar B, Pesole G, Raynal V, Cartron JP. The members of the RH gene family (RH50 and RH30) followed different evolutionary pathways. *J Mol Evol* 1999; 48: 151-9.
6. Marini AM, Matassi G, Raynal V, André B, Cartron JP, Chérif-Zahar B. The human rhesus-associated RhAG protein and a kidney homologue promote ammonium transport in yeast. *Nat Genet* 2000; 26: 341-4.
7. Liu Z, Chen Y, Mo R, Hui C, et al. Characterization of human RhCG and mouse Rhcg as novel nonerythroid Rh glycoprotein homologues predominantly expressed in kidney and testis. *J Biol Chem* 2000; 275: 25641-51.
8. Liu Z, Peng J, Mo R, Hui C, Huang CH. Rh type B glycoprotein is a new member of the Rh superfamily and a putative ammonia transporter in mammals. *J Biol Chem* 2001 (sous presse).
9. Marini AM, Urrestarazu A, Beauwens R, André B. The Rh (rhesus) blood group polypeptides are related to  $\text{NH}_4^+$  transporters. *Trends Biochem Sci* 1997; 22: 460-1.
10. Marini AM, Soussi-Boudekou S, Vissers S, André B. A family of ammonium transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 1997; 17: 4282-93.

#### Baya Chérif-Zahar

*Inserm U. 76, Institut national de transfusion sanguine, 6, rue Alexandre-Cabanel, 75015 Paris, France.*

## ■■■■ BRÈVES ■■■■

■■■■ **L'ABC du cholestérol et du risque coronaire.** On sait depuis longtemps que le risque de mortalité coronaire est inversement corrélé à la concentration plasmatique de cholestérol-HDL (*high density lipoproteins*). L'effet protecteur des HDL (HDL-C) est classiquement attribué à leur rôle central dans le « transport inverse » du cholestérol des tissus périphériques vers le foie, qui est le principal site de catabolisme du cholestérol. En fait, peu de données cliniques permettaient jusqu'à présent de faire réellement le lien entre taux de HDL-C, transport inverse du cholestérol et maladie coronaire. La découverte récente du gène *ABC1* (*ATP binding*

*cassette-1*), dont les mutations sont responsables de la maladie autosomique récessive de Tangier, permet enfin de faire cette relation (*m/s 2000, n°3, p. 421*). Ce gène code pour la protéine responsable de la sortie hors des cellules du cholestérol libre et de son transfert sur les particules HDL naissantes. L'étude de 77 sujets hétérozygotes pour 14 mutations différentes du gène *ABC1*, comparés à des sujets affiliés non porteurs de la mutation, montre une diminution du taux de HDL-C qui s'accroît avec l'âge [1]. Il existe de plus une augmentation d'un facteur trois des accidents coronaires, ceux-ci survenant de façon plus précoce chez les sujets

hétérozygotes. De façon remarquable, le flux sortant de cholestérol (mesuré sur les fibroblastes) est directement corrélé à la baisse de la concentration de HDL-C. On peut ainsi prévoir qu'une baisse de 8 % de la sortie de cholestérol des cellules est responsable d'une diminution de 0,1 mM du taux de HDL-C. Un défaut du transport inverse du cholestérol est donc clairement associé à une diminution des taux de HDL et à une augmentation du risque coronaire. La protéine *ABC1* deviendra-t-elle un jour une nouvelle cible thérapeutique ?

[1. Clee SM, et al. *J Clin Invest* 2000 106: 1263-70.]