

## L'échangeur $\text{Na}^+/\text{H}^+$ : caractérisation et rôle physiologique

L'échangeur sodium/proton contrôle le pH intracellulaire. Stimulé par les facteurs de croissance, il assure l'alcalinisation du milieu intracellulaire indispensable à l'activation de la synthèse d'ADN et donc au déclenchement du cycle mitotique. Des expériences récentes de correction d'un déficit en échangeur par transfert d'ADN ont permis d'isoler des sondes moléculaires du gène codant pour cette molécule.

**Gilles L'Allemain**

Chargé de recherche à l'Inserm

**Jacques Pouysségur**

Directeur de recherche au Cnrs

### RÉFÉRENCES

1. Aronson PS. Kinetic properties of the plasma membrane  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger. *Ann Rev Physiol* 1985 ; 47 : 545-60.
2. Roos A, Boron WF. Intracellular pH. *Physiol Rev* 1981 ; 61 : 296-434.

### ADRESSE

G. L'Allemain, J. Pouysségur : centre de biochimie du Cnrs, université de Nice, faculté des sciences, parc Valrose, 06034 Nice Cedex, France.

Les bicouches phospholipidiques constituant les membranes biologiques sont des structures imperméables aux ions. Au cours de l'évolution, la cellule a donc développé différents systèmes de transports assurant les échanges ioniques transmembranaires, contrôlant ainsi les concentrations des ions de part et d'autre des membranes cellulaires. L'échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  est l'un de ces multiples systèmes couplant l'échange d'un ion  $\text{Na}^+$  contre un proton. Ce transporteur a été caractérisé dans tous les systèmes cellulaires où il a été recherché, depuis l'œuf d'oursin jusqu'à la cellule de mammifère. Une telle conservation phylogénique suggère fortement qu'il soit associé à des fonctions primordiales pour la cellule.

### Fonctionnement de l'échangeur

De nombreuses études cinétiques sur cet antiporteur [1] ont démontré que la réaction d'échange

$\text{Na}^+/\text{H}^+$  est indépendante de l'ATP. C'est un système électro-neutre et réversible, utilisant le gradient entrant de  $\text{Na}^+$  (maintenu entre l'intérieur de toute cellule eucaryote et le milieu extracellulaire, *figure 1A*) pour expulser les protons hors de la cellule et au-delà de leur équilibre électrochimique théorique [2].

L'électroneutralité d'échange (stoechiométrie 1:1) se traduit par une indépendance du système vis-à-vis du potentiel de membrane. La réversibilité implique que le même échangeur peut catalyser une sortie de  $\text{Na}^+$  (ou de  $\text{Li}^+$ ) couplée à une entrée de  $\text{H}^+$  lorsque le gradient transmembranaire est inversé (*figure 1B*).

Nous verrons plus loin comment cette dernière propriété s'est révélée être essentielle, avec la toxicité des ions  $\text{H}^+$  pour la cellule, pour isoler des mutants du système de transport  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ . L'asymétrie de fonctionnement de l'échangeur vis-à-vis du  $\text{H}^+$  est due à la présence de deux sites  $\text{H}^+$  internes, un site de transport et un site régulateur où la fixa-

tion des ions  $H^+$  induit une activation de type allostérique [3].

### Mesure de l'activité d'échange

La présence d'un échange ionique  $Na^+/H^+$  peut être identifiée grâce à plusieurs techniques : par la mesure de flux de sodium radioactif à travers la membrane plasmique de la cellule (flux entrant ou sortant, dépendants du gradient de  $Na^+$  et de la valeur du pH externe et interne) ou par l'enregistrement des variations de pH [4] du milieu externe (en présence d'un milieu non tamponné) ou du cytoplasme en réponse à des variations du gradient transmembranaire de  $Na^+$ . Les variations de pH peuvent être analysées soit par des micro-électrodes à pH, soit à l'aide de molécules dont l'intensité de fluorescence varie avec le pH, comme la carboxyfluoresceïne, ou bien à l'aide d'un acide faible radioactif dont la répartition intracellulaire sera dépendante de la valeur du pH interne [1]. L'addition du diurétique amiloride, un inhibiteur spécifique de cet échange, permet alors de définir la part relative prise par l'échangeur  $Na^+/H^+$  dans les variations de flux de  $Na^+$  ou de pH enregistrées.

### Mécanisme d'activation

La réaction d'échange  $Na^+/H^+$  est à peine détectable aux pH neutres et basiques : le système est dit quiescent. En revanche, toute augmentation interne en  $H^+$  active ce système qui, en augmentant sa capacité d'échange, va expulser les protons cytoplasmiques et ainsi protéger la cellule contre toute acidification létale. Après récupération d'un pH physiologique, le fonctionnement de l'échangeur retourne au niveau basal : cette autorégulation du système, grâce au site  $H^+$  interne régulateur, assure une homéostasie efficace du pH intracellulaire. Un autre mode d'activation est observé en réponse à des stimuli externes. Par exemple, l'addition d'un facteur de crois-

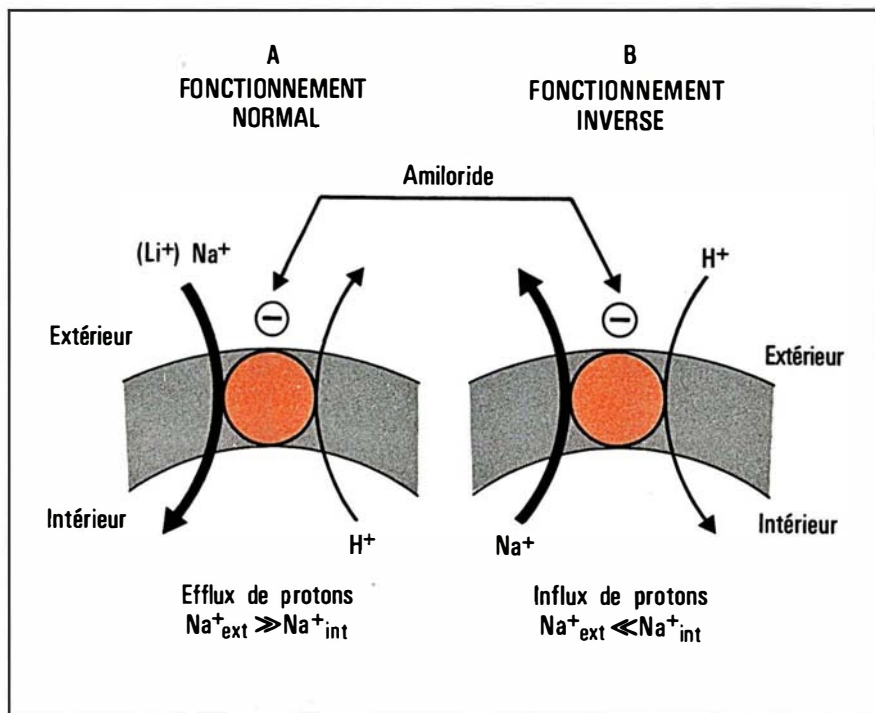


Figure 1. **Fonctionnement du système d'échange  $Na^+/H^+$ .**

sance sur sa cellule-cible entraîne l'activation du système d'échange  $Na^+/H^+$  se traduisant par une alcalinisation persistante du cytoplasme de 0,1 à 0,3 unité pH. Ce phénomène d'activation est observé avec toute une variété de mitogènes, les esters de phorbol ou le sperme au cours de la fertilisation ; il résulte d'un changement d'affinité de l'échangeur pour le site  $H^+$  régulateur. Ce site interne acquiert une affinité plus grande pour le  $H^+$  [5], vraisemblablement à la suite d'un changement de conformation du transporteur. Sachant que la totalité des facteurs de croissance stimule à la fois cet échangeur et différentes activités protéiniques, il semble très probable que le changement conformationnel proposé soit dû à différents états de phosphorylation de la protéine transporteuse. Un autre argument dans ce sens est l'activation du même système  $Na^+/H^+$  par les esters de phorbol, ou par le diacylglycérol

(DAG), activateurs respectivement exogène et endogène de la protéine kinase C [6]. Deux voies distinctes d'activation de l'échangeur  $Na^+/H^+$  sont schématisées dans la figure 2.

### Pharmacologie de l'échangeur

La caractérisation de tout système de transport est facilitée par l'existence d'inhibiteurs spécifiques et de haute affinité. C'est le cas d'un digitalique, l'ouabaïne, pour la  $Na^+, K^+$  ATPase. L'échangeur  $Na^+/H^+$  est, lui, inhibé par un puissant agent diurétique, l'amiloride, qui entre en compétition avec le  $Na^+$  sur son site de fixation. A l'origine, ce diurétique était décrit comme un puissant inhibiteur des épithéliums transportant le sodium. Dans les autres systèmes cellulaires, l'amiloride bloque plus spécifiquement les flux couplés de  $Na^+$  et de  $H^+$ . Mais, à des concentrations physiologiques en  $Na^+$  externe, seule

## RÉFÉRENCES

3. Aronson P, Nee J, Suhm MA. Modifier role of internal  $H^+$  in activating the  $Na^+/H^+$  exchanger in renal microvillus membrane vesicles. *Nature* 1982 ; 299 : 161-3.
4. Moolenaar WH. Regulation of cytoplasmic pH by  $Na^+/H^+$  exchange. *Trends Biochem Sci* 1986 ; 11 : 141-3.
5. Paris S, Pouyssegur J. Growth factors activate the  $Na^+/H^+$  antiporter in quiescent fibroblasts by increasing its affinity for intracellular  $H^+$ . *J Biol Chem* 1984 ; 259 : 10989-94.
6. Castagna M, Takai Y, Kaibuchi K, Sano K, Kikkawa U, Nishizuka Y. Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor promoting phorbol esters. *J Biol Chem* 1982 ; 257 : 7847-51.
7. Fehlmann M, Samson M, Koch KS, Lefert HL, Freychet P. Amiloride inhibits protein synthesis in isolated rat hepatocytes. *Life Sci* 1981 ; 28 : 1295-302.
8. Busa WB. Mechanisms and consequences of pH-mediated cell regulation. *Ann Rev Physiol* 1986 ; 48 : 389-402.
9. Johnson J, Epel D, Paul M. Intracellular pH and activation of sea urchin eggs after fertilization. *Nature* 1976 ; 262 : 661-4.
10. Moolenaar WH. Effects of growth factors on intracellular pH regulation. *Ann Rev Physiol* 1986 ; 48 : 363-76.
11. Rozengurt E. Early signals in the mitogenic response. *Science* 1986 ; 234 : 161-6.
12. Berridge MJ. The molecular basis of communication within the cell. *Sci Am* 1985 ; 253 : 124-34.
13. L'Allemain G, Franchi A, Cragoe E, Pouyssegur J. Blockade of the  $Na^+/H^+$  antiport abolishes growth factor-induced DNA synthesis in fibroblasts. *J Biol Chem* 1984 ; 259 : 4313-9.
14. Pouyssegur J, Chambard JC, Franchi A, Paris S, Van Obberghen-Schilling E. Growth factor activation of an amiloride sensitive  $Na^+/H^+$  exchange system in quiescent fibroblasts : coupling to ribosomal protein  $S_6$  phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982 ; 79 : 3935-8.
15. Pouyssegur J, Sardet C, Franchi A, L'Allemain G, Paris S. A specific mutation abolishing  $Na^+/H^+$  antiport activity in hamster fibroblasts precludes growth at neutral and acidic pH. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984 ; 81 : 4833-7.
16. L'Allemain G, Paris S, Pouyssegur J. Growth factor action and intracellular pH regulation in fibroblasts. Evidence for a major role of the  $Na^+/H^+$  antiport. *J Biol Chem* 1984 ; 259 : 5809-15.

une dose élevée d'amiloride ( $> 1$  mM) bloque complètement l'activité d'échange  $Na^+/H^+$ . Or, différents effets secondaires « parasites » sont dus à l'accumulation de l'amiloride dans les cellules, comme l'inhibition de la synthèse protéique [7].

C'est pourquoi une pharmacologie axée sur la synthèse de dérivés de l'amiloride beaucoup plus puissants que l'amiloride lui-même s'est développée [5]. L'utilisation de telles molécules, aussi efficaces à des concentrations jusqu'à 100 fois plus faibles (figure 3), permet de réduire les effets secondaires non spécifiques

de l'amiloride et, ainsi, de déterminer avec beaucoup moins d'ambiguïté les rôles physiologiques du système d'échange  $Na^+/H^+$ . Malheureusement, il semble que de tels analogues sont rapidement métabolisés in vivo, si bien que seule la structure-mère de l'amiloride est retrouvée active, rendant inutile l'utilisation sur l'organisme entier de tels dérivés plus puissants.

## Rôles physiologiques

Le grand nombre de processus physiologiques qui, de près ou de loin, sont dépendants de la valeur

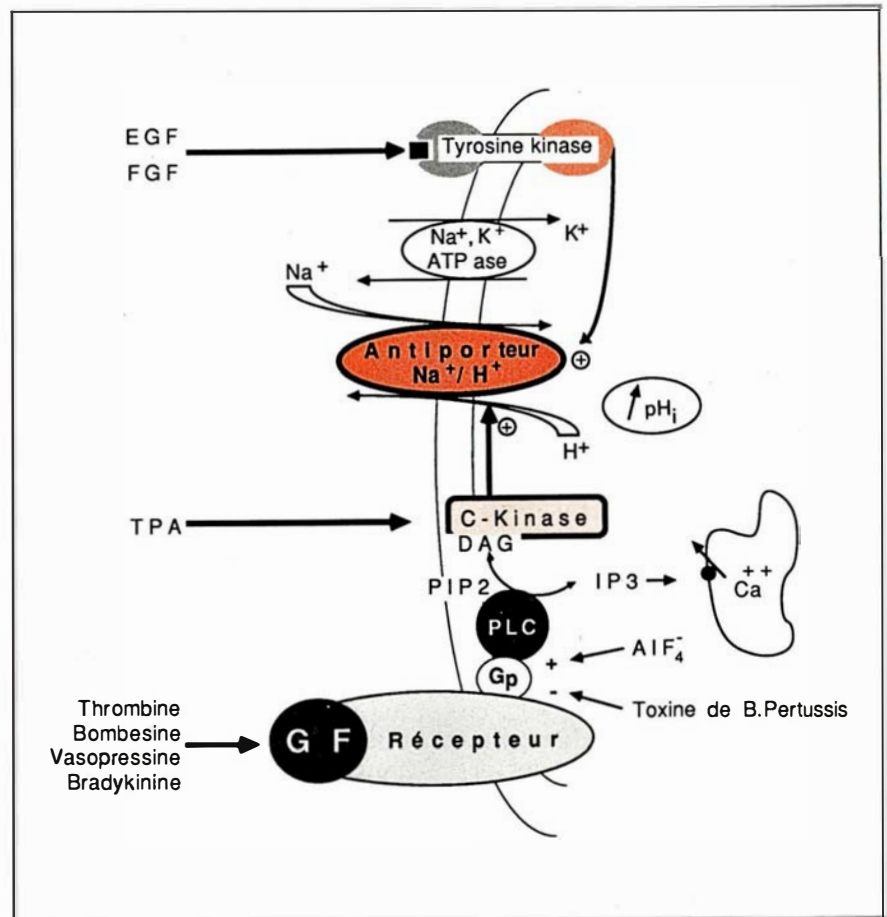


Figure 2. Voies d'activation de l'échangeur  $Na^+/H^+$ . GF = growth factor ; EGF = epidermal growth factor ; FGF = fibroblast growth factor ; TPA = 12-O-tétradécanoyl-phorbol-13-acétate ; DAG = 1,2-diacylglycéról ; PIP2 = phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate ; IP3 = inositol 1,4,5-trisphosphate ; PLC = phospholipase C ; Gp = G-protéine ;  $AIF_4^-$  = ion fluoro-aluminat, analogue structural de l'ion phosphate  $PO_4^{3-}$  ; Toxine de B. Pertussis = toxine de *Bordetella pertussis*, inhibitrice de Gp par une réaction d'ADP-ribosylation ;  $pH_i$  = pH interne.

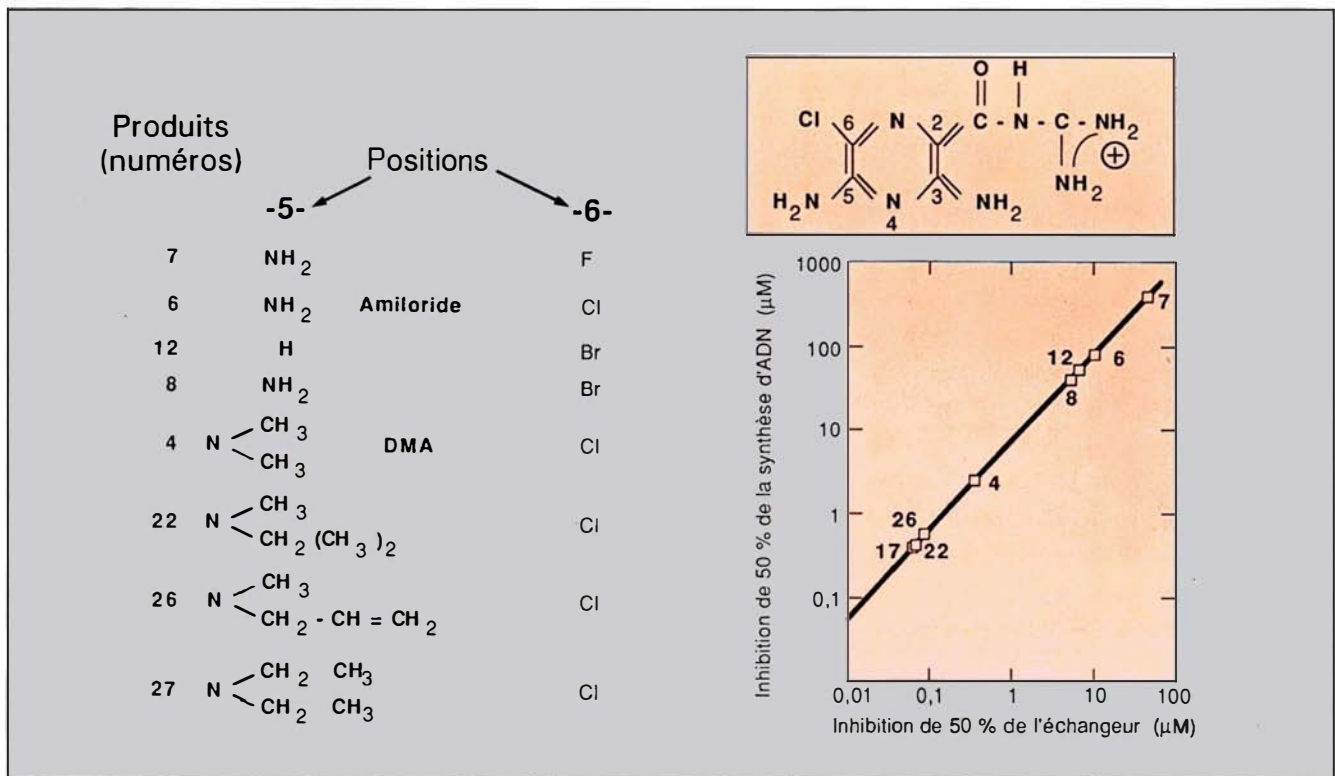


Figure 3. **Corrélation structure-fonction pour les dérivés de l'amiloride entre l'inhibition de l'échangeur Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> (en abscisse) et le blocage de la synthèse d'ADN (en ordonnée).** L'activité de l'échangeur Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> est suivie par la cinétique d'influx de sodium radioactif (<sup>22</sup>Na<sup>+</sup> traceur) en présence d'ouabaine pour bloquer la sortie de Na<sup>+</sup> via la Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> ATPase (voir figure 2). La synthèse d'ADN est déterminée parallèlement par l'incorporation totale de thymidine radioactive obtenue sur les fibroblastes CCL39 après 24 heures de réinitiation par le facteur de croissance α-thrombine. Les doses pour une inhibition de 50 % (ou valeurs d'IC<sub>50</sub>) sont portées sur la courbe. DMA = diméthyl-amiloride. L'encart montre la formule de l'amiloride (produit n° 6). Ses analogues sont indiqués par des numéros.

du pH [8, 9] explique l'intérêt croissant pour l'échangeur Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>, système excréteur de protons. Ainsi, son rôle dans la régulation du pH intracellulaire après une charge acide a été caractérisé dans des cellules neuronales et endothéliales, des cellules du muscle lisse, du muscle squelettique ou du muscle cardiaque, dans des fibroblastes et des lymphocytes, ainsi que dans de nombreuses cellules tumorales en culture [4].

Au cours de la réponse mitogénique [10, 11, 12], l'alcalinisation du cytoplasme de 0,1 à 0,3 unité pH constitue l'un des premiers signaux intracellulaires enregistré dès la fixation d'un mitogène sur son récepteur membranaire. En effet (figure 2), que le récepteur possède une activité tyrosine-

kinase ou qu'il soit couplé à la phospholipase C (PLC) via une protéine liant le GTP (Gp), la stimulation de l'échangeur Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> par les deux voies de transduction du signal mitogénique constitue un marqueur précoce de la réactivation cellulaire.

Le fonctionnement de cet échangeur apparaît crucial pour les processus de division cellulaire puisque les analogues de l'amiloride les plus puissants pour inhiber l'échangeur Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> sont aussi les plus puissants à bloquer la synthèse d'ADN (figure 3) [13], un processus mis en route plusieurs heures après l'addition d'un facteur de croissance à sa cellule-cible. Une étape extrêmement sensible au pH et essentielle pour la progression des cellules dans le cycle cellulaire, est le taux de

synthèse protéique, lui-même lié au degré de phosphorylation de la protéine ribosomale S<sub>6</sub> [14].

Par ailleurs, le développement d'une approche génétique visant à isoler des mutants totalement déficients en activité d'échangeur Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> nous a conduits à définir le rôle joué par l'activation de l'échangeur en réponse aux facteurs de croissance. Basée sur le principe de réversibilité de l'échangeur Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> (figure 1B), la méthode de sélection a consisté à induire une entrée massive et donc létale de H<sup>+</sup> via l'échangeur Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> fonctionnant dans le mode réverse (figure 4, page 586). En conséquence, toute cellule mutante déficiente en activité d'échangeur Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> a pu résister à ce test « suicide » aux H<sup>+</sup>. Cette technique a permis de

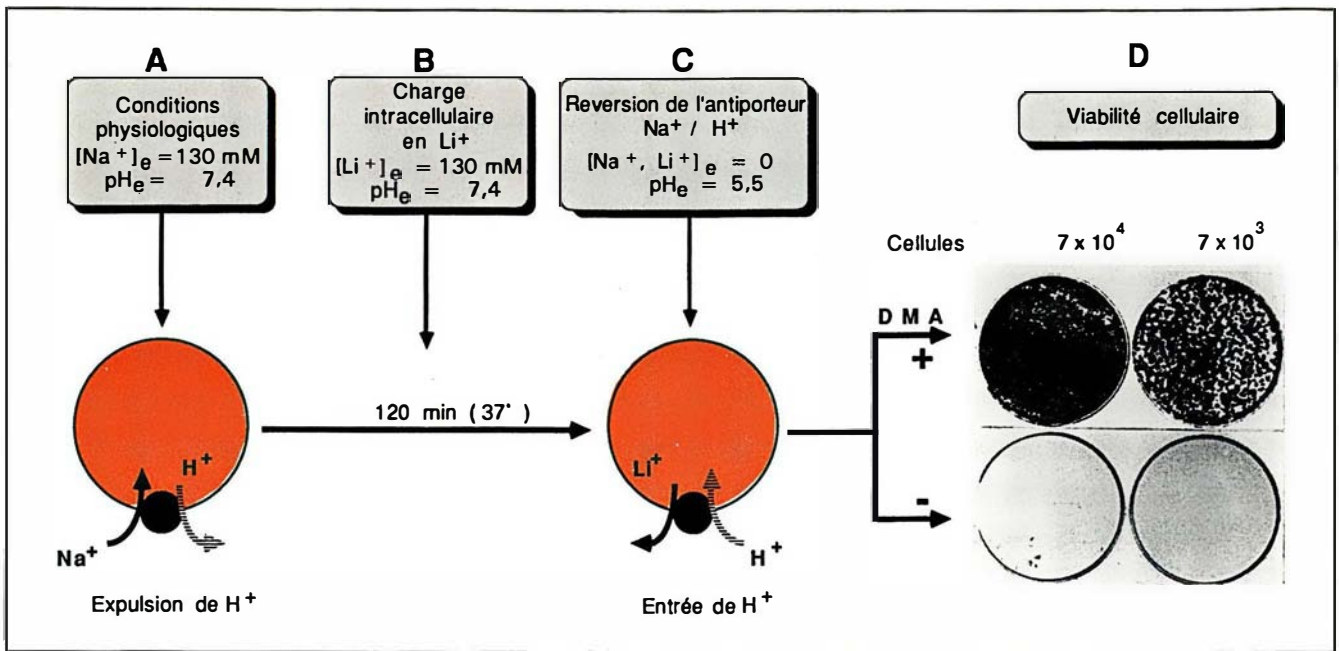


Figure 4. **Principe de sélection de cellules dépourvues d'activité d'échange  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ .** Le fonctionnement normal de l'échangeur (A) est utilisé pour charger les cellules en  $\text{Li}^+$  (B) afin de préparer le gradient sortant de  $\text{Li}^+$  (C) qui est alors couplé à une entrée massive de  $\text{H}^+$  due au pH externe très acide ( $\text{pH}_e = 5,5$ ). La spécificité de la méthode de sélection est testée en déterminant la viabilité des cellules soumises pendant 30 min au suicide par les protons (C) en présence (+) ou non (-) de diméthylamiloride (DMA), un analogue 20 fois plus puissant que l'amiloride lui-même (voir figure 3).  $\text{pH}_e = \text{pH}$  externe ;  $[\text{Na}^+]_e$ ,  $[\text{Li}^+]_e$ ,  $[\text{Na}^+, \text{Li}^+]_e =$  concentrations extérieures en ces cations.

sélectionner le mutant PS120 totalement dépourvu d'activité d'échange  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  [15] à partir de la population CCL39, une lignée établie de fibroblastes de hamster. En réponse aux facteurs de croissance, ce mutant ne subit plus aucune alcalinisation interne [16], démontrant que seul l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  est responsable de cette alcalinisation. Or, le mécanisme de la synthèse d'ADN est un processus biologique très sensible au pH puisque le maximum de mitogénicité est atteint après une variation de 0,2 à 0,3 unité pH (figure 5B). Les deux souches, normale et mutante, possèdent le même seuil de pH interne pour réinitier la réplication de l'ADN (figure 5B), alors que le pH cytoplasmique du variant PS120 est toujours plus acide de 0,2 à 0,3 unité pH que le type sauvage [16] : le pH-seuil de la réinitiation ne pourra donc

être atteint par le mutant qu'à un pH externe plus alcalin. Ainsi, le fonctionnement et donc l'activation de l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  s'avèrent nécessaires pour la croissance du fibroblaste aux pH externes neutres et acides [17]. Ces conclusions ont pu être établies dans des conditions de culture dépourvues de  $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ . En effet, l'addition du tampon bicarbonate masque les différences sauvage/mutant [17, 18] et lève le blocage de la synthèse d'ADN imposé par les inhibiteurs de l'échange  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  [18, 19]. Cette observation nous a conduits à émettre l'hypothèse de l'existence d'un autre système régulateur du pH interne et dépendant de  $\text{HCO}_3^-$ . Cette hypothèse s'est avérée exacte puisque nous avons caractérisé dans la membrane plasmique du fibroblaste un échangeur  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  qui corrige le défaut de  $\text{pH}_{\text{int}}$  chez le mutant

PS120 [18].

En fait, bien qu'une simple alcalinisation interne semble produire à elle seule quelques étapes de la fertilisation chez l'œuf d'oursin [9], elle n'est en aucun cas suffisante pour déclencher la prolifération cellulaire ni même pour faire varier l'état de phosphorylation de  $\text{S}_6$  dans le fibroblaste en culture [20].

Par ailleurs, ce même échangeur n'est plus stimuable dans les myotubes différenciés alors qu'il l'est toujours dans les myoblastes en prolifération [21]. En fait, l'état d'activation est maximal dans les myotubes. Dans les pré-lymphocytes B, l'activation de l'échangeur représente l'étape limitante de leur différenciation [22]. Il reste néanmoins à établir que cet état activé est une caractéristique de tous les tissus différenciés pour démontrer que l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  constitue un

marqueur général du processus de différenciation cellulaire.

De par son fonctionnement, l'antiporteur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  participe aussi à la régulation du taux de  $\text{Na}^+$  intracellulaire (en association avec la pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase) et donc à certains des processus métaboliques associés au  $\text{Na}^+$  [23], comme le transport net de solutés (entre le fluide extracellulaire et l'espace intercellulaire) effectué par les cellules épithéliales de l'intestin, de la vésicule biliaire ou du tubule rénal. De même, son implication a été établie dans la réabsorption du  $\text{Na}^+$  et du  $\text{HCO}_3^-$  au niveau du tubule proximal du néphron. En outre, au niveau de la membrane luminale des cellules épithéliales du petit intestin, du rein (au niveau de l'anse ascendante de Henlé ou du tubule proximal des amphibiens) et de la vésicule biliaire, l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , en coopération avec l'échangeur  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  est responsable de l'absorption nette de  $\text{NaCl}$ . A l'opposé, sur la membrane basolatérale des cellules de la cornée, du pancréas et du plexus choroïde, la présence de l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  permet une sécrétion nette de bicarbonate.

L'échange  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  joue aussi un rôle, après un choc osmotique, dans la régulation du volume interne des lymphocytes, des globules rouges ou au niveau de l'épithélium de la vésicule biliaire [23, 24]. Dans les plaquettes sanguines, le blocage de l'échange  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  semble influencer sur l'activité de la phospholipase  $\text{A}_2$  et sur la formation de l'acide arachidonique [25], précurseur de la synthèse des prostaglandines et des prostacyclines.

### Relations avec quelques états pathologiques

Les transports ioniques transmembranaires interviennent plus ou moins directement lors de certaines complications physiopathologiques. Dans de nombreux cas, la fonction principale de l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  est de s'opposer aux acidoses métaboliques [23].

Le fonctionnement de l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  a également été associé à des phénomènes d'hypertrophie ou d'hyperplasie rénales. En effet, par suite d'une néphrectomie partielle, une plus forte activité d'échange  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  a été observée dans les néphrons résiduels devenus hypertrophiés [26]. En outre, le rôle de ce système d'échange dans l'homéostasie du volume intracellulaire (voir paragraphe précédent) pourrait l'impliquer dans la régulation de certains états hyperplasiques. Ailleurs, la forte stimulation des échanges  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  et  $\text{Na}^+/\text{Li}^+$  détectés au niveau des globules rouges de sujets hypertendus a permis d'envisager une corrélation entre l'activité de l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  et l'état d'hypertension artérielle enregistrée [23]. Néanmoins, afin de relier définitivement le dysfonctionnement de l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  à divers phénomènes

pathologiques, il reste à caractériser les modifications des paramètres cinétiques du système d'échange (affinité des substrats et nombre de transporteurs) et à établir si ces variations se retrouvent de façon reproductible pour un état pathologique donné.

Une récente étude [27] montre que, dans une lignée cellulaire de fibroblastes de hamster, la régulation du pH interne est moins rapide dans le type sauvage que dans plusieurs variants transformés. L'état d'activation de l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  apparaît seul responsable de cette disparité. Cet état activé rend compte d'un pH cytoplasmique plus alcalin dans ces variants transformés établissant un état de plus grande perméabilité vis-à-vis des paramètres de croissance.

La régulation du pH interne apparaît donc comme un facteur modulant l'entrée des cellules dans

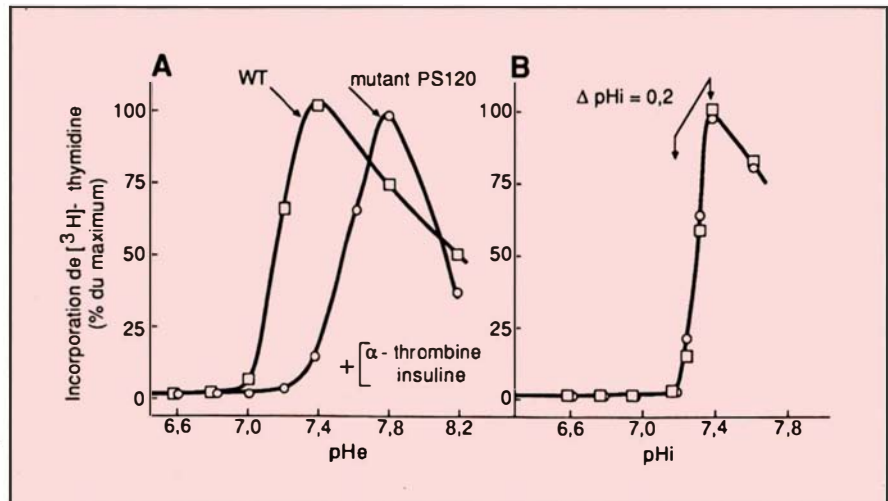


Figure 5. **Dépendance en pH externe (A) et en pH interne (B) de la réinitiation de la synthèse d'ADN** dans les fibroblastes CCL39 (□) et dans leur dérivé PS120, dépourvu d'échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (○). Les cellules quiescentes sont stimulées pendant 24 heures avec la combinaison de facteurs de croissance :  $\alpha$ -thrombine (1 unité/ml) et insuline (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) en présence de thymidine tritiée, précurseur radioactif de la synthèse d'ADN. La synthèse d'ADN est alors déterminée par l'incorporation intracellulaire de  $^3\text{H}$ -thymidine (voir [17] pour détails techniques).  $\text{pH}_i$  = pH interne ;  $\text{pH}_e$  = pH externe.

## RÉFÉRENCES

17. Pouyssegur J, Franchi A, L'Allemain G, Paris S. Cytoplasmic pH, a key determinant of growth factor-induced DNA synthesis in quiescent fibroblasts. *FEBS Lett* 1985 ; 190 : 115-9.
18. L'Allemain G, Paris S, Pouyssegur J. Role of a Na<sup>+</sup>-dependent Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-exchange in regulation of intracellular pH in fibroblasts. *J Biol Chem* 1985 ; 260 : 4877-83.
19. Besterman J, Tyrey S, Cragoe E Jr, Cuatrecasas P. Inhibition of epidermal growth factor-induced mitogenesis by amiloride and an analog : evidence against a requirement for Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984 ; 81 : 6762-6.
20. Chambard JC, Pouyssegur J. Intracellular pH controls growth factor-induced ribosomal protein S<sub>6</sub> phosphorylation and protein synthesis in the G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> transition of fibroblasts. *Exp Cell Res* 1986 ; 164 : 282-94.
21. Vigne P, Frelin C, Lazdunski M. The Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter is activated by serum and phorbol esters in proliferating myoblasts but not in differentiated myotubes. *J Biol Chem* 1985 ; 260 : 8008-13.
22. Rosoff PM, Cantley LC. B lymphocyte differentiation : role of phosphoinositides, C kinase, and Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange. In : Aronson PS, Boron WF, eds. *Current Topics in Membranes and Transport*. Orlando ; Academic Press, 1986 : 193-9.
23. Seifter JL, Aronson PS. Properties and physiologic roles of the plasma membrane sodium-hydrogen exchanger. *J Clin Invest* 1986 ; 78 : 859-64.
24. Aronson PS, Boron WF. Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchange, intracellular pH and cell function. *Current Topics in Membranes and Transport*. Orlando : Academic Press, 1986 : 26.
25. Sweatt JD, Connolly TM, Cragoe EJ Jr, Limbird LE. Evidence that Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange regulates receptor-mediated phospholipase A<sub>2</sub> activation in human platelets. *J Biol Chem* 1986 ; 261 : 8667-73.
26. Vigne P, Jean T, Barbry P, Frelin C, Fine LG, Lazdunski M. <sup>3</sup>H ethylpropylamiloride, a ligand to analyze the properties of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange system in the membranes of normal and hypertrophied kidneys. *J Biol Chem* 1985 ; 260 : 14120-5.
27. Ober SS, Pardee AB. Intracellular pH is increased after transformation of Chinese hamster embryo-fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987 ; 84 : 2766-70.
28. Lagarde A, Pouyssegur J. The Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter in cancer. *Cancer Biochem Biophys* 1986 ; 9 : 1-14.
29. Franchi A, Perucca-Lostanlen D, Pouyssegur J. Functional expression of a human Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene transfected into antiporter-deficient mouse L cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986 ; 83 : 9388-92.

le cycle de division. En revanche, le rôle direct des transporteurs ioniques responsables de cette régulation semble plus difficile à évaluer dans la balance état prolifératif « normal » — état transformé.

Pourtant, les premiers résultats comparant le pouvoir tumoral de CCL39 et de PS120 montrent une très nette baisse du potentiel tumorigène des cellules dépourvues d'échange Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> [28]. Ce résultat suggère qu'in vivo une régulation du pH par le système Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> ne serait pas suffisante pour établir les conditions optimales au développement du tissu tumoral de cellules déficientes en échange Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>.

## Perspectives sur l'échangeur

Il apparaît évident que pour aller plus avant dans les mécanismes d'activation de l'échangeur Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>, l'identification moléculaire du transporteur est requise. Le clonage du gène codant pour la protéine impliquée est un des choix fait dans notre laboratoire pour accéder à la structure moléculaire de l'entité responsable de l'échange Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> [29]. La comparaison avec d'autres transporteurs déjà clonés devrait éclairer sur l'existence de séquence(s) consensus pour les transports ioniques transmembranaires. L'identification de sites de phosphorylation, la démonstration in vivo que l'échangeur est phosphorylable, mais surtout l'existence de certains stades phosphorylés capables d'induire le changement d'affinité pour le proton interne, formeront autant d'étapes progressives pour comprendre le mécanisme d'activation de l'échangeur Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>. Par ailleurs, l'obtention d'une sonde génomique spécifique de l'échange Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> a déjà permis de montrer que des cellules sélectionnées pour une augmentation de l'activité d'échange, le font par amplification du gène. Cette sonde permettra de déterminer si certains états pathologiques sont liés à des altérations génétiques de ce système d'échange ■

## Summary

In eukaryotic cells, the most active mechanism for H<sup>+</sup> extrusion is the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter. This plasma membrane bound countertransporter has the following properties : (1) It is electroneutral and exchanges Na<sup>+</sup> (or Li<sup>+</sup>) for H<sup>+</sup> with a coupling ratio of 1:1 ; (2) H<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, Li<sup>+</sup> and the diuretic inhibitor amiloride all apparently compete for binding at its external transport site ; (3) its functioning is reversible ; the physiological inward-directed Na<sup>+</sup> gradient catalyzes H<sup>+</sup> efflux ; conversely, an outward-directed Na<sup>+</sup> gradient catalyzes H<sup>+</sup> uptake (a property exploited to select by H<sup>+</sup>-suicide deficient mutants) ; (4) it possesses an internal regulatory site whereby H<sup>+</sup> binding exerts an allosteric activation ; (5) growth factors activate this system by increasing the affinity of this internal H<sup>+</sup>-regulatory site ; (6) two signalling mitogenic pathways, one involving protein kinase C stimulation, the other receptor-activated tyrosine kinases play distinct roles in this activation. Finally, the role of this pH-regulating system in growth control, volume regulation and modulation of solute transport across epithelial is presented.

## TIRÉS A PART

J. Pouyssegur : centre de biochimie du Cnrs, université de Nice, faculté des sciences, parc Valrose, 06034 Nice Cedex, France.