

## Échangeur $\text{Na}^+/\text{H}^+$ et régulation du pH des myocytes cardiaques : de la physiologie à la physiopathologie

Danielle Feuvray  
Morris Karmazyn

Le pH intracellulaire influence de multiples aspects de la fonction des cellules cardiaques, *via* ses effets sur l'activité d'enzymes du métabolisme, sur des conductances ioniques membranaires, sur l'homéostasie du calcium intracellulaire et, plus directement, sur la sensibilité au calcium des éléments contractiles. Il n'est donc pas surprenant que les cellules aient élaboré divers mécanismes de transport membranaire pour régler leur pH interne. La régulation du pH intracellulaire est assurée essentiellement par l'activité de mécanismes membranaires capables de transporter des ions  $\text{H}^+$  et  $\text{HCO}_3^-$  à l'extérieur ou à l'intérieur de la cellule. Ces mécanismes maintiennent ou tendent à ramener, s'il s'en écarte, le  $\text{pH}_i$  à sa valeur physiologique proche de 7,2. L'activité de ces protéines spécialisées dans le transport d'acides, ou de bases, à travers la membrane, est finement contrôlée par le pH intracellulaire lui-même, et réglée par des stimulus extracellulaires, voire des signaux intracellulaires. Les mécanismes membranaires alcalinisants sont particulièrement sollicités dans une situation pathologique telle que l'ischémie du myocarde.

### ADRESSES

D. Feuvray : *professeur à l'Université Paris XI*. Laboratoire de physiologie cellulaire, Bâtiment 443, 91405 Orsay Cedex, France. M. Karmazyn : *professeur à l'Université de Western Ontario*. Department of pharmacology and toxicology, London, Ontario N6A 5C1, Canada.

**P**armi les mécanismes de régulation du pH intracellulaire ( $\text{pH}_i$ ), l'antiport dépendant du sodium, ou échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , représente une voie majeure pour la sortie d'ions  $\text{H}^+$  des cellules lors d'une acidification. L'échangeur est stimulé de façon particulièrement active au moment de la reperfusion qui suit un épisode

d'ischémie, bien qu'il puisse aussi être actif pendant l'ischémie. Toutefois, les conséquences de la stimulation de l'échangeur sont beaucoup plus complexes que le simple rétablissement du  $\text{pH}_i$  normal à la suite d'une acidification. L'activation de l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  est associée en effet à un flux entrant d'ions  $\text{Na}^+$ , de même d'ailleurs que l'activation du symport

$\text{Na}^+\text{-HCO}_3^-$ \*, autre mécanisme alcalinisant. Ce flux entrant d'ions  $\text{Na}^+$  crée un déséquilibre osmotique, mais est aussi susceptible, en augmentant la concentration de  $\text{Na}^+$  intracellulaire ( $[\text{Na}^+]_i$ ) sous-membranaire, de modifier l'activité, et même la direction, de l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ . Des changements significatifs de  $[\text{Na}^+]_i$  peuvent alors produire, secondairement, des variations de la concentration de calcium intracellulaire. Ainsi, les mécanismes de régulation du pH intracellulaire dépendant du sodium se trouvent directement impliqués dans l'homéostasie calcique et, par conséquent, dans le contrôle de l'activité contractile cardiaque [1].

### Différentes isoformes de l'échangeur $\text{Na}^+/\text{H}^+$ : l'échangeur $\text{Na}^+/\text{H}^+$ des myocytes cardiaques

L'éjection d'ions  $\text{H}^+$  intracellulaires en échange d'ions  $\text{Na}^+$  extracellulaires est probablement l'un des moyens les plus efficaces d'éliminer l'excès acide résultant du métabolisme des cellules. L'échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  catalyse le flux entrant d'un ion  $\text{Na}^+$  couplé au flux sortant d'un ion  $\text{H}^+$  à travers la membrane plasmique (figure 1). L'énergie nécessaire à l'éjection des ions  $\text{H}^+$  est fournie par la dissipation du gradient sodique entrant établi par l'ATPase  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ; ce processus est électro-neutre. L'échange  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  participe aussi à la régulation du volume des cellules et, en ce qui concerne les cellules épithéliales (rein et intestin), à la réabsorption du sodium. Ces fonctions, diverses et essentielles, sont assurées par une famille d'échangeurs  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (NHE,  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchangers), famille multigénique dont actuellement six isoformes ont été identifiées : NHE1 à NHE6, différant par leur localisation tissulaire et leur sensibilité aux inhibiteurs de référence.

NHE1 a été la première isoforme de l'échangeur isolée, par complément génétique avec de l'ADN génomique humain, d'une lignée cellulaire (dérivée de fibroblastes de souris) totalement dépourvue d'activité d'échange [2]. L'isoforme NHE1

est présente dans tous les types cellulaires de mammifères. C'est la forme ubiquiste, aussi qualifiée de *housekeeping*, en ce sens qu'elle doit assurer les fonctions essentielles précédemment mentionnées, à savoir le maintien du pH<sub>i</sub> et du volume des cellules [3, 4]. C'est aussi l'isoforme qui est exprimée de façon prédominante dans les myocytes cardiaques [5]. Les isoformes NHE2, NHE3 et NHE4 ont une expression tissulaire plus spécifique des tissus épithéliaux (tractus gastro-intestinal et rein) [3, 4] (à l'exception toutefois de NHE4 retrouvée, par exemple, dans la

région hippocampique du cerveau). Quant à NHE5 et NHE6, elles sont exprimées dans des tissus non épithéliaux, en particulier dans le cerveau et le muscle squelettique [3]. En ce qui concerne le niveau d'expression de la protéine NHE1 *in vivo*, il est relativement faible, et il est difficile de détecter la protéine par des méthodes immunologiques. Bien que la présence d'une activité d'échange  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  dans le sarcolemme des myocytes cardiaques ait été mise en évidence il y a une dizaine d'années [6], sa localisation membranaire n'a pu être précisée.

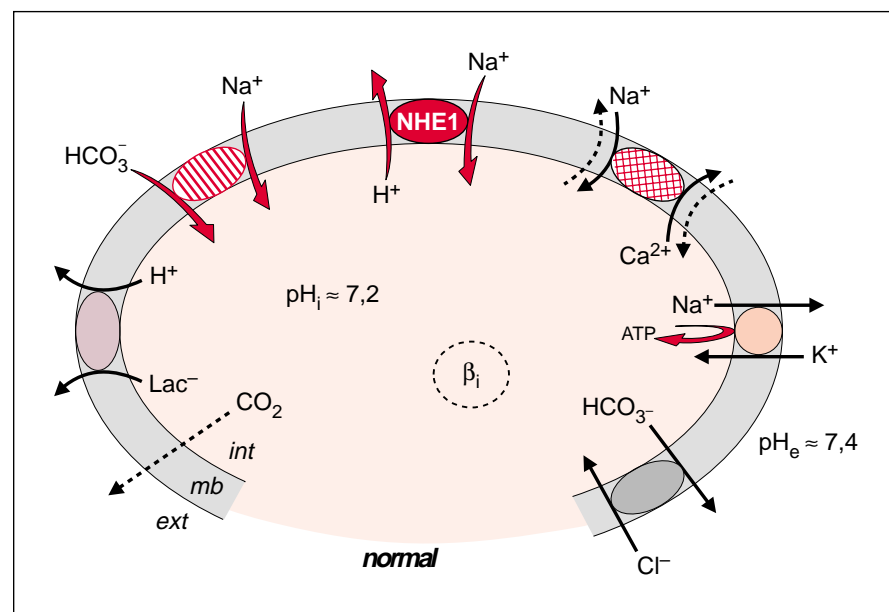


Figure 1. **Transporteurs membranaires participant à la régulation du pH intracellulaire (pH<sub>i</sub>) des myocytes cardiaques.** L'échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  fonctionne comme un antiporteur pour échanger un ion  $\text{H}^+$  contre un ion  $\text{Na}^+$ . NHE1 (NHE pour  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger) est l'isoforme exprimée de façon largement prédominante dans les myocytes cardiaques.  $\text{Na}^+\text{-HCO}_3^-$  représente le co-transporteur, ou symporteur, sodium-bicarbonate. Ces deux transporteurs membranaires dépendants du sodium fonctionnent comme des mécanismes alcalinisants. Le maintien du pH<sub>i</sub> des cellules cardiaques à l'état stationnaire (conditions physiologiques normales) est le résultat d'un équilibre entre l'activité métabolique des cellules, l'activité des systèmes alcalinisants (antiporteur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  et symporteur  $\text{Na}^+\text{-HCO}_3^-$ ), et l'activité d'un système acidifiant fonctionnant comme un antiporteur pour échanger  $\text{Cl}^-$  contre  $\text{HCO}_3^-$ , l'échangeur  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ . Les données expérimentales actuelles apparaissent en faveur d'un rôle essentiel des mécanismes mettant en jeu l'anion  $\text{HCO}_3^-$  pour le maintien du pH<sub>i</sub> des cellules à une valeur proche de 7,2 dans les conditions physiologiques. Le co-transport  $\text{Lac}^-/\text{H}^+$  (lactate-proton) représente un autre mécanisme alcalinisant. Il ne participe vraisemblablement pas à la régulation du pH<sub>i</sub> dans les conditions physiologiques; il est activé lorsqu'il y a eu production importante de lactate, par exemple lors d'une ischémie, et surtout de la reperfusion qui peut suivre l'ischémie.  $\beta_i$  représente le pouvoir tampon intrinsèque des cellules pour les ions  $\text{H}^+$ . Les autres transporteurs figurés sont l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  et l'ATPase  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ . pH<sub>e</sub>: pH extracellulaire; mb: membrane; int: intracellulaire; ext: extracellulaire.

\* Transport couplé, dans la même direction, de deux ions aux charges opposées.

## L'échangeur $\text{Na}^+/\text{H}^+$ (NHE1) et sa régulation dans les myocytes cardiaques

L'échangeur est une protéine constituée de 815 acides aminés, ayant un poids moléculaire de 90 kDa [4]. Sur la base du profil hydrophobe de la séquence d'acides aminés, la molécule NHE1 peut être divisée en deux domaines majeurs: un domaine amino-terminal transmembranaire (comportant environ 500 acides aminés) qui contient 10 à 12 segments, et un large domaine cytoplasmique carboxy-terminal [3, 4] (figure 2). Au domaine transmembranaire est attachée la fonction de transport (échange des ions). C'est aussi au niveau d'un ou plusieurs de ses segments que se fixent les inhibiteurs de l'échange, l'amiloride ou ses dérivés. Le domaine cytoplasmique, hydrophile, contient les éléments indispensables à la régulation de l'activité de l'échangeur. Dans les conditions physiologiques, le principal facteur de régulation de l'activité de l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  est le pH intracellulaire, et l'échangeur est activé par les ions  $\text{H}^+$  dans une gamme de  $\text{pH}_i$  très étroite. La protéine est en effet faiblement active ou presque inactive pour un  $\text{pH}_i$  proche de 7,4; en revanche, à bas  $\text{pH}_i$  ( $\leq 6,5$ ), l'échangeur est activé de façon maximale. L'activité de NHE1 est modulée par différents stimulus extracellulaires, tels que des hormones, les neurotransmetteurs, les facteurs de croissance [7]. La plupart de ces stimulus (ou signaux) extracellulaires activent l'échangeur en déplaçant le seuil d'activation vers des valeurs de  $\text{pH}_i$  plus alcalines que celles auxquelles il est normalement activé. C'est le domaine cytoplasmique carboxy-terminal de NHE1 qui joue alors le rôle d'interface entre les signaux extracellulaires et le transporteur ionique. L'étude des mécanismes par lesquels les signaux extracellulaires sont transmis à l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  a donné lieu à bon nombre de travaux dont les résultats ont été rassemblés dans plusieurs revues récentes [3, 4, 8]. C'est certainement la réponse aux facteurs de croissance, et plus précisément les voies de transmission du signal impliquées dans cette réponse, qui a été la plus étudiée, dans des lignées cellulaires issues de fibroblastes [4]. L'isoforme NHE1 est une protéine constitutivement phos-

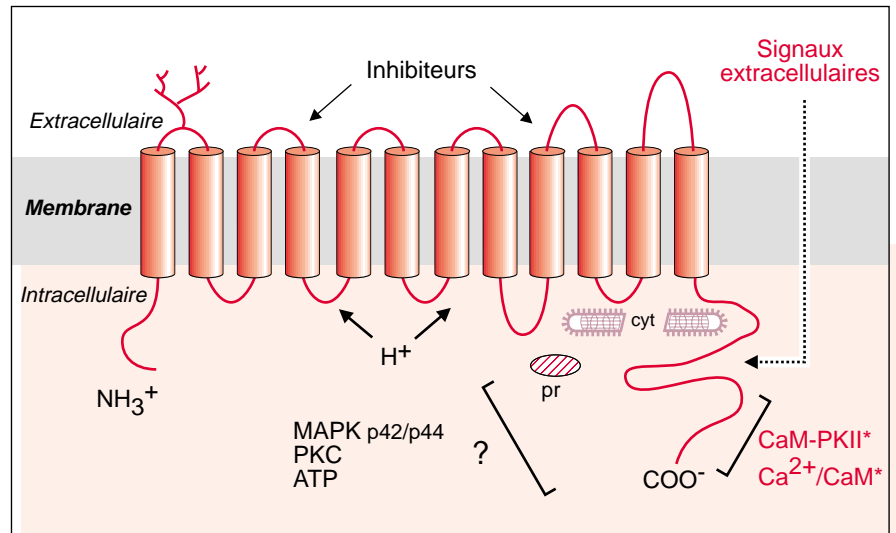


Figure 2. **Structure-fonction de NHE1.** La molécule NHE1 peut être divisée en deux domaines majeurs: un domaine amino-terminal transmembranaire comprenant 10 à 12 segments, auquel est attachée la fonction de transport des ions, et un large domaine cytoplasmique carboxy-terminal [4]. C'est au niveau d'un (ou plusieurs) des segments transmembranaires que se fixent les inhibiteurs de NHE1. Le contrôle de l'activité d'échange peut faire intervenir au moins trois mécanismes différents: (1) une phosphorylation « directe » au niveau du domaine cytoplasmique; (2) la phosphorylation d'une (ou de) protéine(s) régulatrices associées (pr) interagissant avec le domaine cytoplasmique; et (3) l'élévation de la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  via la formation d'un complexe  $\text{Ca}^{2+}$ -calmoduline ( $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ ), complexe se liant à une région du domaine cytoplasmique [4]. Des résultats récents montrent que la cascade d'événements impliquant des protéine-kinases activées par les agents mitogènes (MAPK p42/p44) puisse jouer, via la phosphorylation de protéines associées, un rôle important dans l'activation de NHE1 induite par les facteurs de croissance. L'ATP pourrait être nécessaire à la stabilité d'éléments du cytosquelette (cyt) indispensables au maintien de l'échangeur dans une configuration optimale. ?: non démontré pour les myocytes cardiaques; \*: démontré pour les myocytes cardiaques et fondé sur [11, 12].

phorylée en l'absence de toute stimulation, les sites de phosphorylation (exclusivement des résidus sérine) se situant dans le domaine cytoplasmique carboxy-terminal. La stimulation de l'échangeur en réponse à des facteurs de croissance, qui se traduit par une alcalinisation cytoplasmique, s'accompagne d'une augmentation de sa phosphorylation. Sur la base de cette observation, il a été initialement proposé que la phosphorylation de la protéine NHE1 entraîne son activation. Toutefois, des expériences de mutation-déletion ont montré par la suite que la phosphorylation de la protéine NHE1 elle-même n'était pas suffisante pour rendre compte de la pleine activation de l'échange. Le contrôle de l'activité d'échange peut faire intervenir au moins trois mécanismes différents: (1) une phosphorylation « directe » de NHE1 au niveau du domaine cytoplas-

mique; (2) la phosphorylation d'une (ou de) protéine(s) régulatrices associée(s) interagissant avec le domaine cytoplasmique de NHE1; et (3) l'élévation de la concentration de calcium intracellulaire [ $\text{Ca}^{2+}$ ]<sub>i</sub>, via la formation d'un complexe calcium-calmoduline ( $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ ), complexe se liant à la région comprise entre les acides aminés 636-656 du domaine cytoplasmique [4]. De plus, des résultats obtenus très récemment montrent que la cascade d'événements impliquant des protéine-kinases activées par les agents mitogènes (MAPK p42/p44) joue un rôle important dans l'activation de NHE1 induite par des facteurs de croissance [9]; l'effet est transmis par l'intermédiaire de la phosphorylation de protéines associées qui restent à identifier. A ce jour les résultats obtenus concernant l'isoforme NHE1 cardiaque sont relativement peu nombreux. Diffé-

rentes études ont montré que la régulation de l'expression de l'échangeur NHE1 et de son activité peut être différente dans les myocytes cardiaques de ce qu'elle est dans d'autres types cellulaires [5, 10]. On sait, par exemple, que l'isoforme NHE1 cardiaque ne possède pas de sites consensus de phosphorylation pour la protéine-kinase C (à la différence de l'isoforme NHE1 du muscle lisse vasculaire, par exemple). *In vitro*, d'ailleurs, l'échangeur cardiaque n'est pas phosphorylé par cette enzyme [11]. En revanche, l'existence de sites consensus pour les protéine-kinases dépendantes du complexe calcium-calmoduline (PKII) a été démontrée sur l'isoforme NHE1 cardiaque de lapin, et une PKII peut phosphoryler directement la protéine cardiaque NHE1 *in vitro* [11]. Enfin, la mise en évidence a été faite tout récemment, et pour la première fois au niveau de myocytes cardiaques, du rôle du calcium libre intracellulaire ainsi que de la protéine-kinase dépendante du complexe calcium-calmoduline (PKII), dans la modulation intracellulaire de l'activité de l'échangeur [12]. Une diminution significative du flux sortant d'ions H<sup>+</sup> après une charge acide des cellules est obtenue en présence de BAPTA, un chélateur du calcium intracellulaire. De plus, l'application d'un inhibiteur de la PKII, le KN-62, entraîne un ralentissement de la remontée du pH<sub>i</sub> à la suite d'une acidification.

Dans les myocytes cardiaques, l'ATP apparaît nécessaire à l'activité de l'échangeur [13, 14]. L'inhibition de la phosphorylation oxydative n'influence pas l'activité d'échange; en revanche, l'inhibition de la voie glycolytique l'inhibe [14]. C'est donc l'ATP glycolytique qui est déterminant. Le rôle de l'ATP glycolytique dans le fonctionnement de transporteurs membranaires a déjà été mis en lumière. Toutefois, le mécanisme d'action par lequel l'ATP exerce ses effets peut être ici différent. La sensibilité à l'ATP implique une région (acides aminés 516-566) du domaine cytoplasmique carboxy-terminal [15]. Elle ferait intervenir une protéine associée dont la liaison serait modulée par le taux d'ATP. D'autres résultats, obtenus avec la lignée de fibroblastes PS120, ont montré que l'actine F est co-localisée avec l'échangeur [3]. L'ATP pourrait être nécessaire à la stabilité d'éléments du cytosquelette indispensables au maintien de l'échangeur dans une configuration optimale.

### Modulation neurohormonale de l'activité de l'échangeur Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> des myocytes cardiaques

Les catécholamines règlent l'activité de l'échangeur et les stimulations

adrénergiques a et b exercent des effets opposés. Ainsi, la stimulation des récepteurs adrénergiques a<sub>1</sub> entraîne une légère alcalinisation du pH interne des cellules et accélère la remontée du pH<sub>i</sub> à la suite d'une acidification (Tableau I) [16, 17]. L'effet résulte d'un déplacement de la relation activité d'échange-pH<sub>i</sub> vers une valeur plus alcaline qu'en l'absence de stimulation, c'est-à-dire d'une augmentation de sensibilité de l'échangeur aux ions H<sup>+</sup> intracellulaires. A cet égard, on peut noter que la stimulation a<sub>1</sub>-adrénergique, au niveau du cœur entier, augmente la survenue d'arythmies associées à la reperfusion postischémique [18]. En revanche, la stimulation b-adrénergique abaisse légèrement le pH interne des cellules et ralentit le flux sortant d'ions H<sup>+</sup> transporté par l'échangeur à la suite d'une acidification [16]. La stimulation d'autres récepteurs, par exemple des récepteurs purinergiques par l'ATP extracellulaire, peut aussi participer à la régulation du pH<sub>i</sub> via une activation de l'échangeur [17]. Les effets, dans le sens d'une activation, de l'endothéline, de même que ceux de la thrombine, de l'angiotensine II (par l'intermédiaire des récepteurs AT1), de l'aldostérone ont aussi été décrits [5, 17]. Toutefois, aucun mécanisme précis n'a pu à ce jour être mis en évidence concernant la(les) voie(s) de transmission entre la fixation de ces ligands sur leurs récepteurs et l'activation de l'échangeur. Bien qu'un rôle de la protéine-kinase C ait été proposé dans différentes études, son action ne peut pas être directe puisque, comme il a été mentionné précédemment, il n'existe pas sur l'échangeur de séquence consensus de phosphorylation pour cette kinase. L'activité du symport Na<sup>+</sup>-HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, autre transporteur membranaire alcalinisant [19], dont il faut préciser que, à la différence de l'échangeur Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>, la protéine cardiaque et le gène n'ont pas encore été identifiés, est aussi réglée par divers neuromédiateurs et hormones [5, 17, 20]. Les stimulations a<sub>1</sub>-adrénergiques, b-adrénergiques et purinergiques, modulent l'activité du symport, mais, de façon intéressante, les effets sont opposés à ceux observés pour ces mêmes stimulations sur l'antiport Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> [16].

Tableau I

#### MODULATION NEUROHORMONALE DE L'ACTIVITÉ DE L'ÉCHANGEUR Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>

| Nature de la stimulation     | Effet | Cardiomyocytes de différentes espèces            |
|------------------------------|-------|--|
| a <sub>1</sub> -adrénergique | +     | cobaye, rat                                      |
| b-adrénergique               | -     | cobaye, chien <sup>b</sup> , mouton <sup>b</sup> |
| purinergique <sup>a</sup>    | +     | cobaye, rat                                      |
| endothéline-1                | +     | rat, chien <sup>b</sup>                          |
| muscarinique                 | +     | chien <sup>b</sup>                               |
| angiotensine II              | +     | lapin, furet <sup>c</sup>                        |
| thrombine                    | +     | rat  |
| aldostérone                  | +     | rat nouveau-né                                   |

<sup>a</sup> ATP extracellulaire.

<sup>b</sup> Mise en évidence dans des fibres de Purkinje.

<sup>c</sup> Mise en évidence sur cœur entier.

On ne connaît pas précisément les voies de transmission entre la fixation des ligands sur leurs récepteurs respectifs et l'activation de l'échangeur. Fondé sur les données de [5, 16-17].

## Échangeur $\text{Na}^+/\text{H}^+$ et physiopathologie

Des résultats intéressants, quoique fragmentaires, concernant la régulation de l'activité de l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  dans diverses situations physiologiques et pathologiques [21]. Un niveau important de régulation est représenté par la transcription du gène de l'échangeur. A ce sujet, il a été montré récemment que le facteur de transcription AP-2 est impliqué dans la régulation du gène de NHE1 dans les cellules cardiaques [5]. Plusieurs études ont montré que l'activité d'échange est plus élevée dans le myocarde de nouveau-né que chez l'adulte. Cette observation est corrélée au niveau de synthèse, plus élevé, des ARNm de NHE1 chez le nouveau-né. On peut aussi mentionner que les concentrations de messagers sont augmentées chez l'adulte dans un modèle d'hypertrophie cardiaque induite par surcharge de pression [22]. Toutefois, aucune donnée expérimentale précise n'a pu être obtenue à l'heure actuelle, qui per-

mette d'établir un lien direct entre la stimulation de l'échange  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  et le développement d'une hypertrophie cardiaque. Le diabète expérimental induit par la streptozotocine est, à l'heure actuelle, le seul modèle pathologique connu pour être, à l'inverse, associé à une diminution d'activité de l'échangeur [12, 23]. Dans ce cas, la diminution d'activité apparaît reliée, au moins en partie, à une diminution de la concentration de calcium libre intracellulaire [24]. Quelques résultats expérimentaux suggèrent que l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  joue un rôle dans l'apoptose associée à l'ischémie. Il a été montré, par exemple, qu'une inhibition pharmacologique de l'échange pouvait réduire le développement de l'apoptose [21]. Toutefois, cette observation pourrait être purement fortuite, et d'autres expériences seront nécessaires pour préciser le rôle éventuel de l'échangeur dans ce phénomène. Par ailleurs, certains résultats suggèrent que l'échangeur puisse intervenir à plus long terme, après un infarctus, dans le développement d'une hypertrophie et

le remodelage ventriculaire. Il semble que l'interprétation de ces résultats doit être confirmée par des études plus approfondies. Enfin, le rôle possible de l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , et plus largement du pH intracellulaire, dans le phénomène du préconditionnement à l'ischémie, a été examiné dans un certain nombre de travaux. L'effet protecteur du préconditionnement est associé à une moindre production d'ions  $\text{H}^+$  pendant une ischémie prolongée. En revanche, aucune conclusion claire ne s'est dégagée concernant un rôle de l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  dans l'effet protecteur du préconditionnement [21].

## Échangeur $\text{Na}^+/\text{H}^+$ et ischémie/reperfusion du myocarde

Différentes études sur cœur entier ont montré que l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  est un mécanisme majeur d'expulsion des ions  $\text{H}^+$  au moment de la reperfusion qui suit un épisode d'ischémie [25, 26]. Le rétablissement d'un gradient *trans-sarcolemmal* de protons au moment de la reperfusion entraîne une activation maximale de l'échange  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , avec la cascade d'événements délétères qui en résulte pour la fonction cellulaire cardiaque (figure 3). L'absence de fonctionnement normal de l'ATPase  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , à la suite de l'ischémie, ne permet pas le maintien ou le rétablissement rapide du gradient transmembranaire sodique, lequel est diminué. La diminution de ce gradient a pour conséquence la diminution d'activité d'échange  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  dans le sens d'une sortie de  $\text{Ca}^{2+}$  du cytosol, voire le fonctionnement de l'échangeur en mode inverse c'est-à-dire une entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la cellule et une augmentation excessive du calcium diastolique [27]. En outre, l'activation de l'antiport peut aussi intervenir à la suite d'une stimulation directe par différents agents ou par des métabolites produits au cours de l'ischémie. Ainsi, la production d'endothéline ET-1 est élevée au cours de l'ischémie; l'activation par ce peptide de l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  se traduit par des anomalies des fonctions diastolique et systolique cardiaques [28, 29]. Un autre exemple est donné par un lysophospholipide, la lysophosphatidylcho-

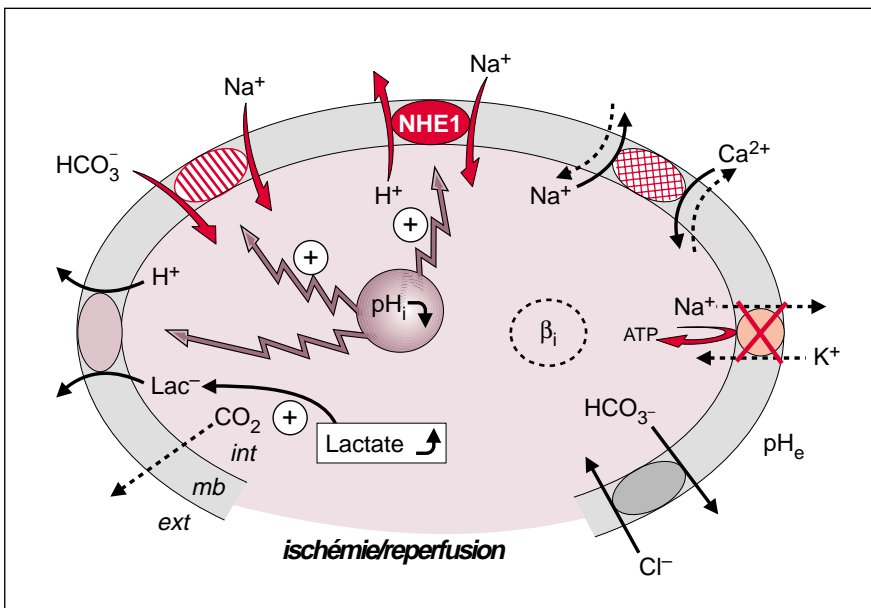


Figure 3. Au cours d'une ischémie, et surtout lors de la reperfusion qui suit un épisode d'ischémie/reperfusion associée à un rétablissement du pH extracellulaire à sa valeur physiologique, les mécanismes alcalinisants que sont l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , le symport  $\text{Na}^+-\text{HCO}_3^-$  et le co-transport  $\text{Lac}^--\text{H}^+$  sont stimulés de façon particulièrement active. L'activation des systèmes membranaires dépendants du sodium, en l'absence de fonctionnement normal de l'ATPase  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  à la suite de l'ischémie, entraîne une diminution du gradient sodique transmembranaire et, par conséquent, une moindre sortie de  $\text{Ca}^{2+}$  via l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ , voire une entrée excessive de  $\text{Ca}^{2+}$ , cet échangeur fonctionnant alors en mode inverse.

line, dont la concentration membranaire augmente au cours de l'ischémie. La lysophosphatidylcholine représenterait un puissant activateur de l'échange  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  dans les myocytes cardiaques [30].

### **Inhibition pharmacologique de l'échangeur $\text{Na}^+/\text{H}^+$**

L'échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  peut être inhibé par différentes substances pharmacologiques; le premier inhibiteur connu est l'amiloride, un agent diurétique, dont la structure possède un noyau guanidinium, auquel l'isoforme NHE1 est particulièrement sensible. Des dérivés plus puissants et plus spécifiques ont été synthétisés, tels que l'éthylisopropylamiloride (EIPA), le méthylisobutylamiloride (MIA) [31], etc. Néanmoins, ces dérivés de l'amiloride présentent aussi un manque de spécificité vis-à-vis de l'antiport  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  puisqu'ils peuvent, à des degrés divers, interagir avec d'autres transporteurs sodiques membranaires. Plus récemment, de nouveaux inhibiteurs ont été développés, de structure notablement différente et présentant une spécificité plus marquée pour l'antiport. Ce sont le 3-méthylsulfonyl-4-pipéridinobenzoyl-guanidine méthanesulfonate (HOE 694) et le 4-isopropyl-3-méthylsulfonylbenzoyl-guanidine-méthanesulfonate (HOE 642 ou cariporide). Le HOE 642 suscite un intérêt tout particulier car il apparaît comme un inhibiteur sélectif de l'isoforme NHE1 cardiaque [32], et nombre d'études laissent entrevoir ses possibilités d'utilisation comme agent thérapeutique [32-34]. On peut d'ailleurs ajouter à cet égard qu'il fait actuellement l'objet d'une évaluation clinique internationale dans le cadre de l'étude GUARDIAN. Comme plusieurs revues récentes le soulignent [21, 33], il existe en effet nombre de travaux apportant des résultats expérimentaux en faveur d'un rôle protecteur de l'inhibition de l'échange  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  contre les altérations de l'équilibre ionique induites par l'ischémie, et plus encore par la reperfusion post-ischémique, parmi d'autres situations physiopathologiques.

### **Conclusions**

L'échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (NHE1) est un élément majeur de régulation du pH interne des myocytes cardiaques. Il fonctionne comme un transporteur ionique alcalinisant, tout comme le symport  $\text{Na}^+\text{-HCO}_3^-$  caractérisé plus récemment. Si nombre de travaux ont été consacrés au cours des dix dernières années à l'étude de l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  des cardiomyocytes, les mécanismes précis qui soutiennent le contrôle de son activité restent cependant à élucider, notamment les voies de transmission intracellulaires entre la fixation de ligands régulateurs sur leurs récepteurs membranaires et l'activation de l'échange, le mécanisme des effets de l'ATP intracellulaire, le rôle du cytosquelette, etc. En ce qui concerne le symport  $\text{Na}^+\text{-HCO}_3^-$ , le gène et la protéine de ce transporteur n'ont pas été identifiés pour l'instant au niveau cardiaque. On peut toutefois espérer que la découverte récente de l'ADN complémentaire et de la protéine d'un co-transporteur  $\text{Na}^+\text{-HCO}_3^-$  rénal [35, 36] facilite l'identification moléculaire du transporteur des cardiomyocytes et, à plus ou moins brève échéance, la synthèse d'un inhibiteur spécifique qui fait défaut à l'heure actuelle. L'absence d'un tel inhibiteur rend pour l'instant plus difficile l'étude de la participation du symport  $\text{Na}^+\text{-HCO}_3^-$  à la régulation du  $\text{pH}_i$  des myocytes cardiaques dans des conditions pathologiques. Cependant, les travaux utilisant la spectroscopie RMN du phosphore  $^{31}$  pour la détermination du  $\text{pH}_i$  sur cœur entier ont permis d'estimer la contribution de ce mécanisme alcalinisant à la suite d'une ischémie [37]. Ces travaux montrent que l'activation du co-transporteur intervient, conjointement avec celle de l'antiport  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , pour régler le pH interne des cellules. Néanmoins, et de façon paradoxale, l'activation soudaine de ces mécanismes de régulation du  $\text{pH}_i$  dépendants du sodium peut aussi représenter un facteur déterminant de perturbation de l'homéostasie ionique des cellules ■

### **RÉFÉRENCES**

1. Orchard CH, Kentish JC. Effects of changes of pH on the contractile function of cardiac muscle. *Am J Physiol* 1990; 258: C967-81.
2. Sardet C, Franchi A, Pouyssegur J. Molecular cloning, primary structure and expression of the human growth factor-activatable  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter. *Cell* 1989; 56: 271-80.
3. Orłowski J, Grinstein S.  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchangers of mammalian cells. *J Biol Chem* 1997; 272: 22373-6.
4. Wakabayashi S, Shigekawa M, Pouyssegur J. Molecular physiology of vertebrate  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchangers. *Physiol Rev* 1997; 7: 51-74.
5. Fliegel L, Wang H. Regulation of the  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger in the mammalian myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 1997; 29: 1991-9.
6. Pierce GN, Philipson KN.  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchange in cardiac sarcolemmal vesicles. *Biochem Biophys Acta* 1985; 818: 109-16.
7. Fliegel L, Dibrov P. Biochemistry and molecular biology of the  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger: an overview. In: Fliegel L, ed. *The  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger*. Austin: RG Landes Company, 1996: 1-20.
8. Counillon L, Pouyssegur J. Structure-function studies and molecular regulation of the growth factor activatable sodium-hydrogen exchanger (NHE-1). *Cardiovasc Res* 1995; 29: 147-54.
9. Bianchini L, L'Allemain G, Pouyssegur J. The p42/p44 mitogen-activated protein kinase cascade is determinant in mediating activation of the  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger (NHE1 isoform) in response to growth factors. *J Biol Chem* 1997; 272: 271-9.
10. Takaichi K, Balkovetz DF, Meir EV, Warnock DG. Cytosolic pH sensitivity of an expressed human NHE-1  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger. *Am J Physiol* 1993; 264: C944-50.
11. Fliegel L, Walsh MP, Singh D, Wong C, Barr A. Phosphorylation of the carboxy-terminal domain of the  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger by  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase II. *Biochem J* 1992; 282: 139-45.
12. Le Prigent K, Lagadic-Gossman D, Feuvray D. Modulation by  $\text{pH}_o$  and intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  of  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchange in diabetic rat isolated ventricular myocytes. *Circ Res* 1997; 80: 253-60.
13. Weissberg PL, Little PJ, Cragoe EJ Jr, Bobik A. The pH of spontaneously beating cultured rat heart cells is regulated by an ATP-calmodulin-dependent  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiport. *Circ Res* 1989; 64: 676-85.
14. Wu ML, Vaughan-Jones RD. Effect of metabolic inhibitors and second messengers upon  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchange in the sheep cardiac Purkinje fibre. *J Physiol (Lond)* 1997; 478: 301-13.
15. Ikeda T, Schmitt B, Pouyssegur J, Wakabayashi S, Shigekawa M. Identification of cytoplasmic subdomains that control pH-sensing of the  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger (NHE1): pH maintenance, ATP-sensitive, and flexible loop domains. *J Biochem* 1997; 121: 295-303.

## RÉFÉRENCES

16. Lagadic-Gossman D, Vaughan-Jones RD. Coupling of dual acid extrusion in the guinea-pig isolated ventricular myocyte to  $\alpha_1$ - and  $\beta$ -adrenoreceptor. *J Physiol (Lond)* 1993; 464: 49-73.
17. Pucéat M, Vassort G. Neurohumoral modulation of intracellular pH in the heart. *Cardiovasc Res* 1995; 29: 178-83.
18. Yasutake M, Avkiran M. Exacerbation of reperfusion arrhythmias by alpha adrenergic stimulation: a potential role for receptor mediated activation of sarcolemmal sodium-hydrogen exchange. *Cardiovasc Res* 1995; 29: 222-30.
19. Le Prigent K, Lagadic-Gossman D, Mongodin E, Feuvray D.  $\text{HCO}_3^-$ -dependent alkalinizing transporter in adult rat ventricular myocytes: characterization and modulation. *Am J Physiol* 1997; 273: H2596-603.
20. Kohout TA, Rogers TB. Angiotensin II activates the  $\text{Na}^+\text{-HCO}_3^-$  symport through a phosphoinositide-independent mechanism in cardiac cells. *J Biol Chem* 1995; 35: 20432-8.
21. Fröhlich O, Karmazyn M. The Na-H exchanger revisited: an update on Na-H exchange regulation and the role of the exchanger in hypertension and cardiac function in health and disease. *Cardiovasc Res* 1997; 36: 138-48.
22. Takewaki S, Kuro OM, Hiroi Y. Activation of  $\text{Na}^+\text{-H}^+$  antiporter (NHE-1) gene expression during growth, hypertrophy and proliferation of the rabbit cardiovascular system. *J Mol Cell Cardiol* 1995; 27: 729-42.
23. Lagadic-Gossman D, Chesnais JM, Feuvray D. Intracellular pH regulation in papillary muscle cells from streptozotocin-diabetic rats: an ion-sensitive microelectrode study. *Pflug Arch* 1988; 412: 613-7.
24. Lagadic-Gossman D, Buckler KJ, Le Prigent K, Feuvray D. Altered  $\text{Ca}^{2+}$  handling in ventricular myocytes isolated from diabetic rats. *Am J Physiol* 1996; 270: H1529-37.
25. Khandoudi N, Bernard M, Cozzone P, Feuvray D. Intracellular pH and role of  $\text{Na}^+\text{-H}^+$  exchange during ischaemia and reperfusion of normal and diabetic rat hearts. *Cardiovasc Res* 1990; 24: 873-8.
26. Feuvray D. The regulation of intracellular pH in the diabetic myocardium. *Cardiovasc Res* 1997; 34: 48-54.
27. Pierce GN, Czubyrt MP. The contribution of ionic imbalance to ischemia/reperfusion-induced injury. *J Mol Cell Cardiol* 1995; 27: 53-63.
28. Khandoudi N, Ho J, Karmazyn M. Role of  $\text{Na}^+\text{-H}^+$  exchange in mediating effects of endothelin-1 on normal and ischemic/reperfused hearts. *Circ Res* 1994; 75: 369-78.
29. Karmazyn M. The role of endothelins in cardiac function in health and disease. In: Karmazyn M, ed. *Myocardial ischemia: mechanisms, reperfusion, protection*. Basel: Birkhäuser Verlag, 1996: 209-30.

## Summary

### $\text{Na}^+\text{-H}^+$ exchange and $\text{pH}_i$ regulation in cardiac myocytes: physiology and pathophysiology

Intracellular pH ( $\text{pH}_i$ ) can exert profound effects on cardiac function and the cardiac myocyte possesses regulated mechanisms for maintaining intracellular pH at physiological values. Among these processes, the sodium-hydrogen exchanger (NHE) represents a major mode of proton extrusion after acidosis, although other regulatory processes such as bicarbonate-dependent transporters are also of importance. At the present time, six exchanger genes are known to exist in mammals. NHE1 has been recognized for some time as the ubiquitous «housekeeping» isoform. It is the sole isoform detectable in the cardiac myocyte and its function and regulation has the greatest relevance for cardiovascular physiology and pathology. The activity of NHE1 can be modulated by a number of growth factors, hormones and neurotransmitters. There is extensive evidence supporting the concept that the  $\text{Na}^+\text{-H}^+$  exchange represents an effective target for pharmacologic intervention for the protection of the ischemic and reperfused myocardium. Earlier studies have relied to a large degree on the use of amiloride or amiloride analogues to assess the role of the exchanger in tissue injury. Their conclusions, which are based on the assumption that the amiloride effect is mediated by its specificity for NHE, are reinforced by the more recent studies in which a different class of highly potent NHE1 inhibitors with dissimilar structure (such as the HOE 642) was used. Studies published within the past few years have indeed supported the concept of NHE1 involvement in myocardial ischemic and reperfusion injury. Although the activity of the exchanger can be stimulated by ischemia, its stimulation is particularly strong at the time of reperfusion. The idiosyncrasies of nature, however, are often suggestive of much more complex consequences of homeostatic processes than are first apparent, and NHE activation is no exception. Accordingly, experimental evidence has shown that stimulation of the exchanger, despite its necessity for  $\text{pH}_i$  restoration after acidosis, may contribute (likely together with another  $\text{Na}^+$ -dependent process, the  $\text{Na}^+\text{-HCO}_3^-$  symport) to myocardial injury. The concomitant influx of sodium ions creates an ionic imbalance that can also result in elevations in intracellular calcium concentrations through sodium-calcium exchange, thus producing potentially deleterious calcium overloading conditions. Therefore, the  $\text{Na}^+\text{-H}^+$  exchange is a paradoxical phenomenon because it is a major mechanism for restoration of  $\text{pH}_i$  after ischemia. As a consequence, however, cell injury occurs.

30. Hoque ANE, Haist JV, Karmazyn M.  $\text{Na}^+\text{-H}^+$  exchange inhibition protects against mechanical, ultrastructural and biochemical impairment induced by low concentrations of lysophosphatidylcholine in isolated rat hearts. *Circ Res* 1997; 80: 95-102.

31. Moffat MP, Karmazyn M. Protective effects of the potent  $\text{Na}^+\text{-H}^+$  exchange inhibitor methylisobutyl amiloride against post-ischemic contractile dysfunction in rat and guinea-pig hearts. *J Mol Cell Cardiol* 1993; 25: 959-71.

32. Scholz W, Albus U, Counillon L, et al. Protective effects of HOE 642, a selective sodium-hydrogen exchange subtype 1 inhibitor, on cardiac ischaemia and reperfusion. *Cardiovasc Res* 1995; 29: 260-8.

33. Karmazyn M. Sodium-hydrogen exchange in myocardial ischemic and reperfusion injury. Mechanisms and therapeutic implications. In: Fliegel L, ed. *The  $\text{Na}^+\text{-H}^+$  exchanger*. Austin: RG Landes Company, 1996: 189-215.

34. Chakrabarti S, Hoque ANE, Karmazyn M. A rapid ischemia-induced apoptosis in isolated rat hearts and its attenuation by the sodium-hydrogen exchange inhibitor HOE 642 (cariporide). *J Mol Cell Cardiol* 1997; 29: 3169-74.

35. Burnham CE, Amlal H, Wang Z, Shull GE, Soleimani M. Cloning and functional expression of a human kidney  $\text{Na}^+\text{-HCO}_3^-$  cotransporter. *J Biol Chem* 1997; 272: 19111-4.

36. Romero MF, Hediger MA, Boulpaep EL, Boron WF. Expression cloning and characterization of a renal electrogenic  $\text{Na}^+\text{-HCO}_3^-$  cotransporter. *Nature* 1997; 387: 409-13.

37. Khandoudi N, Bernard M, Cozzone P, Feuvray D. Mechanisms of intracellular pH regulation during posts ischemic reperfusion of diabetic rat hearts. *Diabetes* 1995; 44: 196-202.

## TIRÉS À PART

D. Feuvray.