

## Les échangeurs anioniques cardiaques : gènes multiples, protéines multiples, fonctions multiples ?

### Les échangeurs d'anions, protéines ubiquitaires

La fonction la plus connue de l'échangeur  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  est de relayer le flux sortant passif, à partir des hématies, des ions  $\text{HCO}_3^-$  formés par l'hydratation intra-érythrocytaire du  $\text{CO}_2$  sanguin. Cet échangeur est une glycoprotéine de 90-100 kDa appelée bande 3 d'après ses propriétés de mobilité électrophorétique [1-3]. Cette protéine est le transporteur d'ions le plus rapide connu à ce jour. Il peut échanger  $10^5$  anions/s [4]. La bande 3 est une protéine majeure de la membrane érythrocytaire représentant environ 30 % du poids des protéines membranaires. La protéine est codée par le gène *AE1*, l'un des membres de la famille génomique des échangeurs d'anions (*AE*, *anion exchanger*). Cette famille est distincte de celle des gènes codant pour les canaux transportant les ions chlorure. De nombreuses protéines immunologiquement apparentées à la bande 3 érythrocytaire ont été identifiées dans la plupart des tissus des vertébrés [5]. Toutes sont codées par l'un des gènes *AE*. Ces derniers sont au nombre de 5 (*AE0* à *AE4*) dont 3 (*AE1*, *AE2* et *AE3*) ont déjà été clonés à partir de l'ADN extrait de différents tissus [3, 6]. *AE1* semble être le gène ancestral exprimé tôt au cours de l'évolution chez des vertébrés inférieurs tels que la lamproie [7]. Tous les échangeurs anioniques codés par les gènes de cette famille sont formés de 14 domaines transmembranaires, ont leurs domaines carboxy- et amino-terminaux intracellulaires (figure 1), et présentent une forte analogie de séquence

(60 % à 80 % d'acides aminés identiques selon les domaines [8]).

### Fonctions des échangeurs anioniques

La régulation de la concentration intracellulaire des ions  $\text{Cl}^-$ , et plus directement des ions  $\text{HCO}_3^-$ , permet également celle du pH intracellulaire. Les AE sont les seuls échangeurs ioniques capable d'acidifier le cytosol par flux sortant passif des ions  $\text{HCO}_3^-$ . Une étude récente de l'expression des gènes *AE* au cours de

l'embryogenèse montre qu'ils sont présents et fonctionnels très tôt (stade 2 cellules) et qu'ils sont indispensables au développement de l'embryon ; l'inhibition de l'activité d'échange anionique ne permet pas le passage au stade de blastocyste [9].

Ces échangeurs anioniques présentent en outre au moins trois autres fonctions qui ont été particulièrement bien montrées pour *AE1*. (1) L'*AE1* fixe en effet certains enzymes de la glycolyse, participant ainsi à la régulation de cette voie métabolique

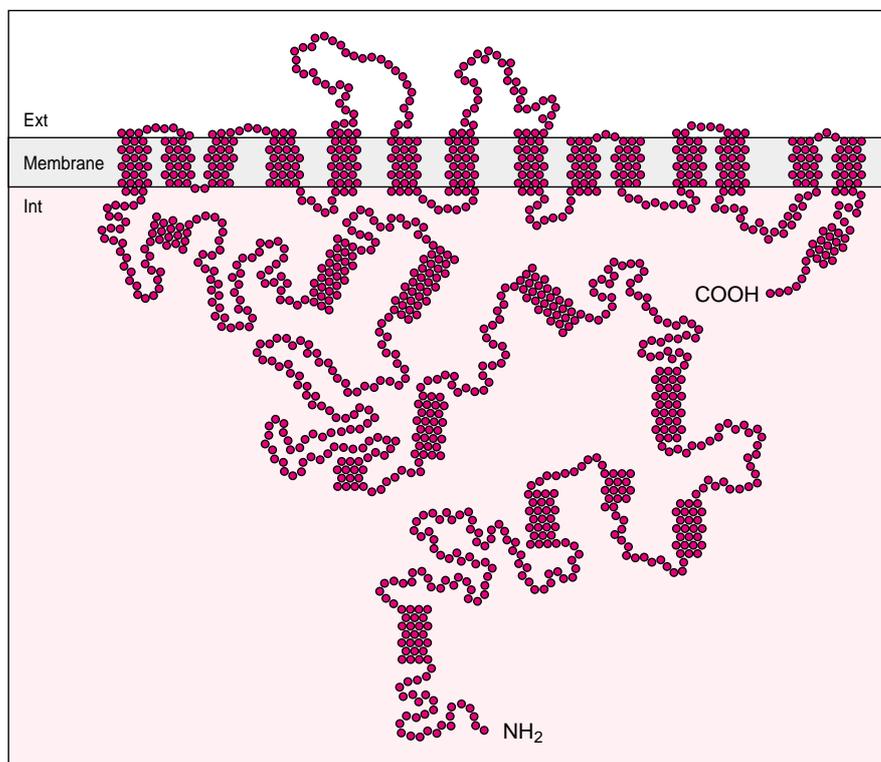


Figure 1. Structure de l'*AE3* de cerveau de souris ([26] modifié d'après [8]).

dans l'érythrocyte [10]. (2) La protéine AE1 est liée par son domaine amino-terminal à l'ankyrine érythrocytaire, protéine servant de liaison entre la membrane et le complexe spectrine-actine du cytosquelette. Elle participe ainsi à la fonction du squelette lors des déformations des hématies, déformations parfois extrêmes, nécessaires à leur circulation dans les capillaires [11, 12]. (3) Enfin, cette protéine peut engendrer un antigène dit du vieillissement (ou antigène de sénescence). Bien que le mécanisme de la formation de cet antigène ne soit pas totalement élucidé, les nombreuses données de la littérature disponibles dans ce

domaine permettent d'avancer l'hypothèse que, à la suite d'une protéolyse de l'AE1, un ou plusieurs épitopes de la protéine apparaissent à la surface cellulaire engendrant ainsi un site antigénique. Des anticorps autologues circulants forment des complexes avec le facteur du complément C3b et se lient à la protéine. L'opsonisation de l'érythrocyte permet alors sa phagocytose par les macrophages. Cette cascade d'événements cellulaires condamne l'érythrocyte à une mort programmée. Le signal qui déclenche la formation de l'antigène du vieillissement est jusqu'à présent inconnu; et son identification constitue donc encore un

véritable défi scientifique d'autant plus que les échangeurs anioniques semblent participer également, par le même mécanisme, à la mort des neurones et probablement d'autres types cellulaires [7].

Cette protéine à multiples fonctions, toutes aussi importantes pour la vie cellulaire, devient un centre d'intérêt considérable. Bien que notre connaissance de l'AE1 érythrocytaire ait beaucoup progressé, cette protéine étant depuis 25 ans l'objet d'une intense curiosité, la synthèse et la fonction des échangeurs anioniques des autres tissus, parmi lesquels le tissu cardiaque, sont beaucoup moins bien connues.

### Que savons-nous des échangeurs d'anions dans le tissu cardiaque?

L'histoire spécifique des échangeurs anioniques cardiaques est beaucoup plus récente que celle de la bande 3 érythrocytaire. Vaughan-Jones à Oxford a mis en évidence l'existence d'un échangeur  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  dans le myocarde en 1979 [13]. Bien que les propriétés de transport ionique de cet échangeur aient été bien caractérisées, aucune étude biochimique de la protéine responsable de cet échange d'anions n'avait été entreprise dans ce tissu jusque récemment. Il a fallu attendre 10 ans pour que soient publiés les résultats d'une étude de dépistage en *Northern blot* de l'expression des ARNm des échangeurs anioniques dans divers tissus, dont le myocarde [14]. Les ARNm codant pour les échangeurs anioniques cardiaques se présentent sous la forme de nombreux transcrits (*Tableau I*). En utilisant une bibliothèque d'ADNc d'estomac, de rein et de cerveau, Kudrycki *et al.* [14] mirent en évidence trois transcrits *AE1* de 4,6, 4,1 et 3,6 kb et deux transcrits *AE3* de 3,8 et 4,4 kb. Un faible signal fut révélé par une sonde d'ADNc *AE2*. Les transcrits *AE1* de 4,1 kb et *AE3* de 3,8 kb sont exclusivement exprimés dans le myocarde. *AE3* est spécifiquement exprimé dans les cellules excitables, neurones et cellules cardiaques. En outre, le transcrit *AE3* de 3,8kb ayant été seulement révélé dans le cœur, ce dernier a été la cible privilégiée des biologistes moléculaires pour le clo-

Gènes	Transcrits	Espèces	Références
<i>AE1</i>	4,6 kb <b>4,1 kb</b> 3,6 kb	rat	[14]
<i>AE3</i>	4,4 kb <b>3,8 kb</b>	rat, souris, homme	[14] [16, 17]

Les transcrits en caractères gras sont exclusivement exprimés dans le myocarde.

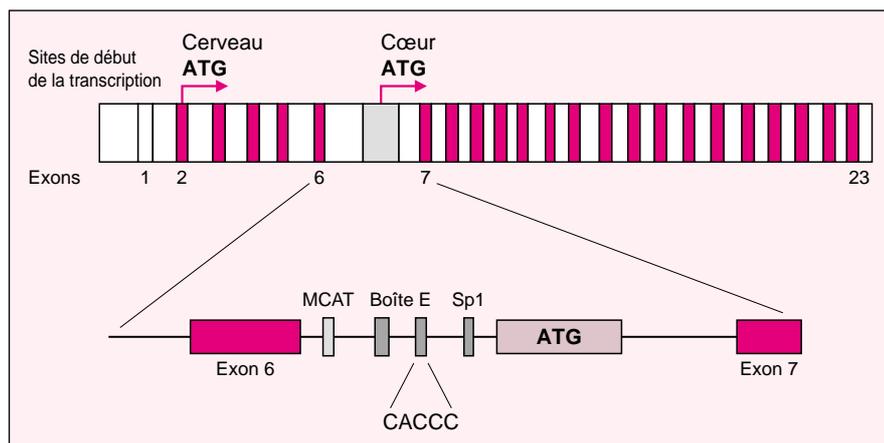


Figure 2. **Cartographie du gène AE3 de rat.** Le même gène code pour les protéines AE3 neuronale et cardiaque. Ces deux protéines diffèrent dans leur partie aminoterminal; la transcription de la protéine cardiaque débute après l'exon 6 du gène, et est sous la dépendance d'un promoteur spécifique du tissu cardiaque; celui-ci comporte un site possible de liaison du facteur de transcription Sp1, une boîte E qui pourrait lier un facteur de transcription musculaire, et une copie de l'élément M-CAT, élément souvent présent dans les promoteurs des gènes spécifiques des muscles. (D'après [15, 16].)

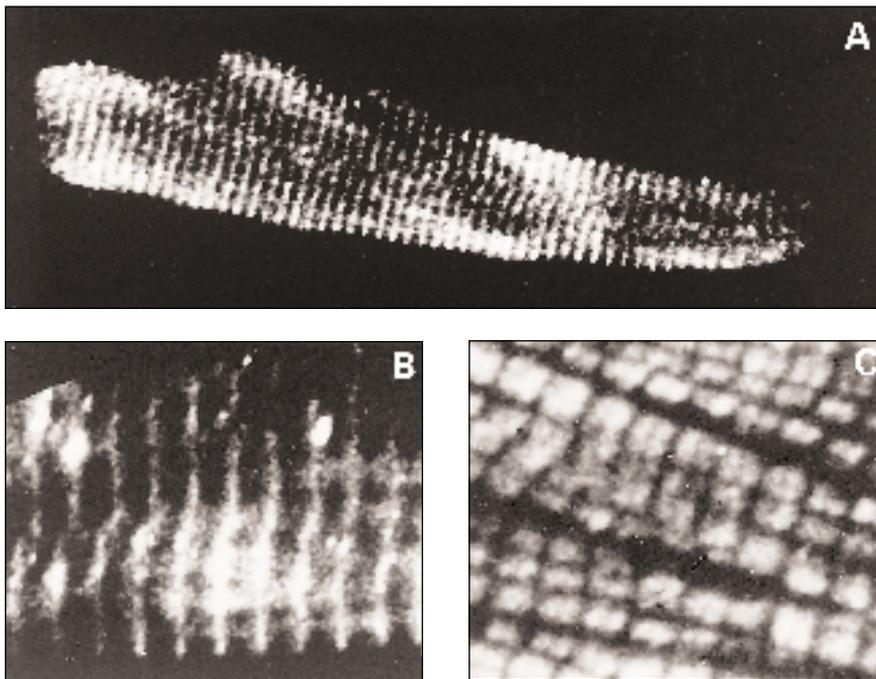


Figure 3. **Localisation immunocytochimique des AE cardiaques.** A. La cellule cardiaque a été incubée avec un anticorps anti-bande 3 après fixation et perméabilisation chimiques. La localisation des AE est révélée par un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome. La figure montre une image en microscopie confocale du marquage du sarcolemme et au niveau des tubules T des AE, protéine(s) immunologiquement proches de la bande 3 érythrocytaire. B. L'image à plus fort grossissement montre le marquage des AE au niveau des stries z à comparer au marquage antimyosine (C).

nage de son ADNc. En 1992, Linn *et al.* [15] présentèrent le premier clone des AE cardiaques. Une sonde préparée à partir de l'ADNc de l'AE3 d'estomac dépista dans une bibliothèque d'ADNc de cœur de rat un transcrite de 3,8 kb codant pour une protéine de 1030 acides aminés, spécifiant une masse molaire d'environ 114 kDa. Le domaine 5'-terminal était plus court que celui de la forme neuronale (produit par le transcrite de 4,4 kb) et était spécifique de l'AE3 cardiaque alors que le domaine 3'-terminal non traduit et les séquences codantes étaient identiques à ceux de l'AE3 du cerveau. La protéine qui en résultait se distinguait donc de l'AE3 du cerveau (masse molaire de 160 kDa) par sa séquence aminoterminal. Les deux transcrits provenaient néanmoins du même gène. Le promoteur, également spécifique du tissu cardiaque, comportait

un site possible de liaison du facteur de transcription Sp1. Il contenait une copie de l'élément M-CAT, élément souvent présent dans les promoteurs des gènes spécifiques des muscles (figure 2). Nous n'en savons pas plus sur la régulation de ce gène, mais il sera important de la préciser car la fonction de la protéine engendrée pourrait se révéler indispensable au développement cellulaire [9]. Il faut noter que le transcrite 3,8 kb cardiaque est 17 fois plus exprimé chez la souris adulte que chez le fœtus du rongeur [16]. Au contraire, l'expression de l'AE3 long neuronal (4,4 kb) diminue au cours du développement.

Le clonage de l'isoforme cardiaque de l'AE3 s'est poursuivi chez l'homme. Yannoukakos *et al.* [17] isolèrent et séquencèrent deux ADNc de l'AE3 humain. Ils codaient pour des protéines de 1232 acides aminés

(bAE3 pour *brain* AE3) et de 1034 acides aminés (cAE3); cette dernière correspondait à une isoforme cardiaque semblable à celle déduite de l'ADNc cloné chez le rat. Le gène cAE3 est exprimé dans le ventricule et l'oreillette alors que le gène bAE3 ne s'exprime que dans l'oreillette [16]. Le promoteur du gène est particulièrement bien conservé chez les rongeurs et chez l'homme [16]. Le gène codant pour l'AE3 est localisé sur le chromosome 2 [17] alors que les gènes AE1 et AE2 sont localisés, respectivement, sur les chromosomes 17 (locus q21-qter) et 7 (locus q35-q36). Cette localisation chromosomique a été établie également par d'autres auteurs [18]. Le locus fut précisé sur la bande cytogénétique 2q36, proche du marqueur D2S163 (*highly polymorphic dinucleotide repeat marker*). Les auteurs suggèrent qu'il est possible que le gène de l'AE3 soit impliqué dans des désordres génétiques.

Bien que les messagers des gènes AE aient été bien étudiés ces trois dernières années, il reste à savoir si tous les transcrits sont réellement traduits en protéine dans le myocarde. Nous avons récemment abordé cette question par une approche immunologique, encouragés par la forte homologie de structure des AE. L'utilisation d'anticorps anti-bande 3 érythrocytaire humaine totale et d'anticorps dirigés contre des peptides de synthèse correspondant à des domaines spécifiques des protéines AE1 ou AE3, nous a permis d'identifier dans les cellules ventriculaires de rat deux protéines de 120 et 80 kDa codées respectivement par les gènes AE3 et AE1. Nous ne savons pas encore aujourd'hui si la protéine de 80 kDa est un produit tronqué du transcrite AE1 de 4,6 kDa qui code pour la bande 3 érythrocytaire ou si elle provient de la traduction d'un des transcrits de plus faible longueur, notamment le transcrite de 4,1 kb spécifique du myocarde. Une observation plus précise des *Western blots* révèle la présence d'un doublet AE3 à 120-125 kDa. Des antisérums dirigés contre des domaines C-terminaux de l'AE1 de souris reconnaissent, outre un doublet de protéines à 80 kDa, une protéine de plus faible poids

moléculaire (70 kDa). Des expériences en cours permettront de mieux identifier ces protéines (différents états de glycosylation, de phosphorylation, autres isoformes...). Une étude d'immunofluorescence associée à la microscopie confocale avec un anticorps anti-bande 3 totale reconnaissant les deux échangeurs anioniques dans des cellules cardiaques de rat isolées nous a permis de les localiser dans le sarcolemme et le long des tubules transverses (figure 3). Cette localisation cellulaire permet une régulation spatiale homogène du pH intracellulaire, et suggère, en outre, qu'au moins un des échangeurs anioniques joue un rôle dans la liaison du cytosquelette au sarcolemme des cellules cardiaques. La micro-injection intracellulaire de l'anticorps inhibe significativement l'activité d'échange  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ . Il est donc raisonnable de penser que l'un des deux ou les deux AE est (sont) un (des) échangeur(s) ionique(s) dans la cellule cardiaque. L'incubation des cellules avec un antisérum anti-AE1 dirigé contre un épitope proche du site de liaison du DIDS (4,4' diisothiocyanostilbène, 2,2' disulfonate, un inhibiteur des transporteurs d'ions chlorure) diminue l'efficacité du DIDS à inhiber l'activité d'échange ionique. L'AE1 joue donc un rôle dans l'échange d'anions [19]. Nous avons poursuivi notre étude de la synthèse et de la localisation intracellulaire des protéines AE au cours du développement cardiaque. Dans les cellules cardiaques de rats nouveau-nés de 2-3 jours, les deux isoformes AE1 et AE3 sont déjà produites. L'échange  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  est également fonctionnel et présente les mêmes propriétés (dépendance de la concentration de  $\text{Cl}^-$  extracellulaire et inhibition par le DIDS) que l'échangeur des cellules de rat adulte. D'abord présents dans le système de Golgi (cellules à 3 jours de culture) les AE migrent vers les costamères, zones de connexion entre le cytosquelette et la membrane après 6-9 jours de culture [20]. Les AE présentent des sites consensus pour certaines kinases (protéine kinase A, protéine kinase C, tyrosine kinases...) suggérant une régulation neurohormonale pour la fonction de

ces protéines. L'activité d'échange anionique de ces AE cardiaques est, de fait, réglée par des neuromédiateurs. L'ATP extracellulaire, un neuromédiateur libéré par les terminaisons nerveuses des systèmes sympathique et parasympathique, stimule cette activité d'échange, déclenchant une acidification intracellulaire du myocyte cardiaque [21-23]. La voie de transmission du signal purinergique jusqu'à la protéine AE met en jeu une tyrosine kinase, probablement cytosolique. Des inhibiteurs de tyrosine kinases inhibent l'effet purinergique sur l'échangeur ionique. La phosphorylation sur des sites tyrosine de l'AE se développe rapidement sous l'action de la stimulation purinergique et ne concerne que l'AE1. Cette donnée renforce l'hypothèse selon laquelle l'AE1 est un échangeur ionique dans la cellule cardiaque ([22], manuscrit en préparation). Utilisé à des concentrations plus élevées, mais semblables à celles observées lors de situations de souffrance cardiaque, l'ATP induit une acidification pouvant aller jusqu'à 0,4 unité pH à l'origine d'une facilitation du CICR (*Ca-induced Ca release*) [23]. Cet effet peut entraîner une arythmie [24]. La stimulation  $\beta$ -adrénergique déclenche également l'activité d'échange ionique à la suite de l'augmentation de l'AMPc intracellulaire [25]. La cible de la protéine kinase A, à savoir l'AE1 ou l'AE3, reste à déterminer, les deux échangeurs présentant des sites consensus pour cette kinase. La présence de deux isoformes AE1 et AE3 ainsi que de multiples transcrits dans le myocarde complique l'étude de ces protéines. Le bAE3 est probablement un échangeur ionique dans le cerveau [26] bien que cette isoforme synthétisée dans des cellules hôtes se révèle moins efficace que l'AE2 [27]. Il nous faut aussi rester prudents quant à la fonction de transport ionique du cAE3. En effet, la synthèse de cAE3 dans des ovocytes de xénope après injection de son ARNm permet de mettre en évidence une activité d'échange ionique  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  très modérée lorsqu'on la compare à l'activité mesurée après synthèse de l'AE1 ou de l'AE2 dans le même système hôte [17]. Il reste incontestable-

ment à différencier les fonctions respectives de ces protéines. Nous avons abordé cette question en utilisant un oligonucléotide antisens dirigé contre le site de début de la transcription du cAE3 de 3,8 kb, seule séquence clonée à l'heure actuelle. La transfection dans des cellules cardiaques en culture de rats nouveau-nés de l'oligonucléotide antisens supprime jusqu'à 80 % de l'expression de l'AE3. Cette approche se révèle donc prometteuse pour l'avenir.

Les échangeurs anioniques participent-ils à la fonction du cytosquelette cardiaque? Ce rôle est suggéré par l'observation que l'AE3 lie l'ankyrine [28] et par la localisation membranaire des AE cardiaques. Sont-ils régulateurs de la glycolyse cardiaque? Aucune donnée n'est disponible pour répondre à cette question. Néanmoins, outre la possibilité de liaison des enzymes glycolytiques à l'AE1, l'acidification intracellulaire déclenchée par l'activation des AE doit modifier le potentiel d'oxydoréduction (rapport NADH/NAD) de la cellule et donc l'équilibre des voies métaboliques. Sont-ils à l'origine d'un antigène du vieillissement et participent-ils ainsi à la mort cellulaire cardiaque? Cette question est fondamentale puisque le mécanisme de la mort cellulaire cardiaque au cours du vieillissement est totalement inconnu. Enfin, des anomalies de structure ou d'expression des AE ont été associées à des anomalies des cellules sanguines mais aussi du tissu hépatique [29]. Des recherches dans le domaine cardiovasculaire doivent être orientées vers cette hypothèse. Outre la fonction basale des échangeurs anioniques, l'activation neurohormonale de l'un d'eux peut être une source d'arythmie ventriculaire. Une surexpression de cet AE cardiaque renforcerait ce phénomène pathologique ■

**Michel Pucéat**  
**Guy Vassort**

*Inserm U. 390, laboratoire de physiopathologie cardiovasculaire, hôpital A.-de-Ville-neuve, 271, avenue du Doyen-Giraud, 34295 Montpellier Cedex, France.*

## RÉFÉRENCES

1. Fairbanks G, Steck TL, Wallach DFH. Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry* 1971; 10: 2606-23.
2. Sahlany JM. *Erythrocyte band 3 protein*. Boca Raton, Florida: CRC Press, 1990.
3. Tanner MJA. Molecular and cellular biology of the erythrocyte anion exchanger (AE1). *Semin Hematol* 1993; 30: 34-57.
4. Wang DN. Band3 structure, flexibility and function. *FEBS Lett* 1994; 346: 26-31.
5. Kay MMB, Tracey CM, Goodman JR, Cone JC, Bassel PS. Polypeptides immunologically related to band are present in nucleated somatic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; 80: 6882-6.
6. Alper SL. The band 3-related anion exchanger (AE) gene family. *Annu Rev Physiol* 1991; 53: 549-64.
7. Kay MMB, Cover C, Schluter SSF, Bernstein RM, Machalonis JJ. Band 3, the anion transporter, is conserved during evolution: implications for aging and vertebrate evolution. *Cell Mol Biol* 1995; 41: 833-42.
8. Wood PG. The anion exchange proteins: homology and secondary structure. In: Bamberg E, Passow H, eds. *Progress in cell research*, vol. 2. New York-Berlin-Heidelberg: Elsevier Science Publishers BV, 1992: 325-52.
9. Zhao Y, Chauvet PJP, Alper SL, Baltz JM. Expression and function of bicarbonate/chloride exchangers in the preimplantation mouse embryo. *J Biol Chem* 1995; 270: 24428-34.
10. Low PS, Rathinavelu P, Harrison ML. Regulation of glycolysis via reversible enzyme binding to the membrane protein, Band 3. *J Biol Chem* 1993; 268: 14627-8.
11. Bennett V. Spectrin-based membrane skeleton: a multipotential adaptor between plasma membrane and cytoskeleton. *Physiol Rev* 1990; 70: 1029-59.
12. Delaunay J, Dhermy D. Le squelette érythrocytaire et les maladies génétiques de la forme du globule rouge. *médecine/sciences* 1990; 6: 563-70.
13. Vaughan-Jones RD. Regulation of chloride in quiescent Purkinje fibres studied using intracellular chloride and pH-sensitive microelectrode. *J Physiol* 1979; 295: 111-37.
14. Kudrycki KE, Newman PR, Shull GE. cDNA cloning and tissue distribution of mRNAs for two proteins that are related to the band 3 Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> exchanger. *J Biol Chem* 1990; 265: 462-71.
15. Linn SC, Kudrycki KE, Shull GE. The predicted translation product of a cardiac AE3 mRNA contains an N terminus distinct from that of the brain AE3 Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> exchanger. *J Biol Chem* 1992; 267: 7927-31.
16. Linn SC, Askew R, Menon AG, Scull GE. Conservation of an AE3 Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> exchanger cardiac-specific exon and promoter region and AE3 mRNA expression patterns in murine and human hearts. *Circ Res* 1995; 76: 584-91.
17. Yannoukakos D, Stuart-Tilley A, Fernandez HA, Fey P, Duyk G, Alper SL. Molecular cloning, expression, and chromosomal localization of two isoforms of the AE3 anion exchanger from human heart. *Circ Res* 1994; 75: 603-14.
18. Su YR, Klanke CA, Houseal TW, Linn SC, Burk SE, Varvil TS, Otterud BE, Shull GE, Leppert MF, Meneon AG. Molecular cloning and physical and genetic mapping of the human anion exchanger isoform 3 (SLC2C) gene to chromosome 2q36. *Genomics* 1992; 22: 605-9.
19. Pucéat M, Korichneva I, Cassoly R, Vassort G. Identification of Band 3-like proteins and Cl/HCO<sub>3</sub> exchange in isolated cardiomyocytes. *J Biol Chem* 1995; 270: 1315-22.
20. Korichneva I, Pucéat M, Cassoly R, Vassort G. The Cl/HCO<sub>3</sub> exchanger in developing neonatal cardiac cells. *Circ Res* 1995; 77: 556-64.
21. Pucéat M, Clément O, Vassort G. Extracellular ATP activates the Cl/HCO<sub>3</sub> exchanger in single rat cardiac cells. *J Physiol* 1991; 444: 241-56.
22. Pucéat M, Cassoly R, Vassort G. Purinergic stimulation induces a tyrosine phosphorylation of a band 3-like protein in isolated rat cardiac cells. *J Physiol* 1993; 459: 226P.
23. Pucéat M, Clément O, Scamps F, Vassort G. Extracellular ATP-induced acidification leads to cytosolic calcium transient rise in single rat cardiac myocytes. *Biochem J* 1991; 274: 55-62.
24. Vassort G, Pucéat M, Scamps F. Modulation of myocardial activity by extracellular ATP. *Trends Cardiovasc Med* 1994; 4: 236-40.
25. Désilets M, Pucéat M, Vassort G. Chloride dependence of pH modulation by  $\beta$ -adrenergic agonist in rat cardiomyocytes. *Circ Res* 1994; 75: 862-9.
26. Kopito RR, Lee BS, Simmons DM, Lindsey AE, Morgans CW, Schneider K. Regulation of intracellular pH by a neuronal homolog of the erythrocyte anion exchanger. *Cell* 1989; 59: 927-37.
27. Lee BS, Gunn RB, Kopito RR. Functional differences among nonerythroid anion exchangers expressed in a transfected human cell line. *J Biol Chem* 1991; 266: 11448-54.
28. Morgan CW, Kopito RR. Association of the brain anion exchanger, AE3 with the repeat domain of ankyrin. *J Cell Sci* 1993; 105: 1137-42.
29. Prieto J, Chang Q, Garcia N, Diez J, Medina JF. Abnormal expression of anion exchanger genes in primary biliary cirrhosis. *Gastroenterology* 1993; 105: 572-8.

## TIRÉS À PART

M. Pucéat.