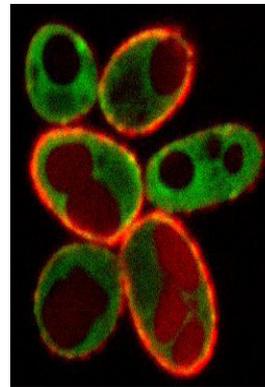


► L'ammonium, ubiquitaire sur Terre, joue des rôles majeurs et distincts chez la plupart des êtres vivants. Alors qu'il peut constituer une source azotée pour les microorganismes et les plantes, c'est un produit métabolique cytotoxique activement détoxiqué par le foie chez les animaux. Par ailleurs, chez ces derniers, la synthèse d'ammonium au niveau du rein est impliquée dans l'homéostasie acide/base. Le transport d'ammonium dans les cellules est assuré par une famille de protéines, appelée Mep-Amt-Rh, qui est conservée dans tout le règne vivant et qui comprend notamment les facteurs Rhésus humains. Cette revue met en évidence l'importance du modèle « levure » tant dans l'étude de la régulation fine et rapide de ces protéines que dans la caractérisation fonctionnelle des membres Mep-Amt-Rh d'origines diverses. ◀

De la découverte des transporteurs d'ammonium Mep-Amt microbiens aux facteurs Rhésus humains

Mélanie Boeckstaens



Laboratoire de biologie du transport membranaire, IBMM, université Libre de Bruxelles, 12, rue des Professeurs Jeener et Brachet, 6041 Gosselies, Belgique.
mboeckst@ulb.ac.be

L'ammonium dans le monde vivant

L'ammonium¹ apparaît ubiquitaire sur Terre, bien que sa concentration varie fortement d'un écosystème à l'autre. La forme chargée NH_4^+ est en équilibre constant avec sa forme neutre, l'ammoniac NH_3 , qui est une base faible ($\text{pK}_a = 9,25$ à 25°C , en phase aqueuse)². Dans la majorité des conditions physiologiques, le NH_4^+ prédomine de loin sur le NH_3 . L'ammonium constitue une source d'azote pour de nombreux microorganismes comme les bactéries et les levures, mais aussi pour les plantes. Il occupe une position centrale dans le métabolisme azoté, à la jonction du catabolisme et de

l'anabolisme. Néanmoins, ce composé peut se révéler toxique à fortes concentrations notamment chez les espèces végétales.

Chez les animaux, l'ammonium est surtout connu en tant que produit métabolique cytotoxique [1]. Chez l'homme, l'ammonium, notamment issu du catabolisme des protéines, est détoxiqué en urée et en glutamine par le foie. Une augmentation de sa concentration sanguine, par exemple lors d'un dysfonctionnement hépatique, affecte le métabolisme de nombreux tissus et plus spécifiquement le système nerveux central pouvant mener à une paralysie cérébrale. À côté de ses effets toxiques, l'ammonium issu de la glutaminolyse³ rénale apparaît comme un régulateur crucial de l'équilibre acido-basique [2]. Enfin, il a été récemment décrit comme un activateur d'autophagie favorisant la prolifération des cellules tumorales [3].

Mise en évidence de protéines spécifiques du transport de l'ammonium

Bien que l'ammonium joue un rôle crucial comme source azotée ou régulateur du pH, les voies spécifiques de transport de ce composé à travers la bicouche lipidique de la membrane cellulaire sont restées longtemps méconnues. Il était en effet généralement admis que la diffusion de la forme non chargée, NH_3 , était la voie de transport majeure de l'ammonium.

¹ Le terme « ammonium » est ici utilisé pour désigner la somme des deux formes ($\text{NH}_4^+ + \text{NH}_3$). Lorsqu'une distinction sera nécessaire, les formules chimiques « NH_3 » ou « NH_4^+ », ou les qualificatifs « neutre » ou « chargé » seront employés.

² On rappelle que plus l'acide est fort plus le pK_a est petit avec $\text{pH} = \text{pK}_a + \log[\text{A}^-]/[\text{AH}]$.

³ Transformation de la glutamine en glutamate et en ammonium sous l'action de la glutaminase.

Les protéines de transport spécifiques de l'ammonium ont été mises en évidence en utilisant un mutant de la levure *Saccharomyces cerevisiae*⁴ déficient pour ses systèmes de transport endogènes de la molécule. En 1994, par complémentation de fonction dans cette souche mutante, deux premiers gènes codant des transporteurs d'ammonium ont été isolés : *MEP1* (*methylammonium permease*) de la levure *S. cerevisiae* et *AMT1;1* (*ammonium transporter*) de la plante *Arabidopsis thaliana*, leur expression restaurant la croissance du mutant en présence d'ammonium (à la concentration de 1 mM) comme unique source d'azote [5, 6]. Il a été ainsi défini une nouvelle famille de transporteurs membranaires largement conservée, dénommée Mep-Amt. De nombreux transporteurs d'ammonium seront identifiés par homologie de séquences ainsi que par complémentation de fonction dans la levure. C'est ainsi que les facteurs Rhésus, dont la fonction demeurerait jusqu'alors inconnue, ont été apparentés aux transporteurs d'ammonium, définissant donc la superfamille de protéines Mep-Amt-Rh [7] (Figure 1).

Selon le degré de conservation de leurs séquences, deux familles se distinguent au sein de la superfamille Mep-Amt-Rh : les Mep-Amt et les Rh. Les protéines de la famille Mep-Amt sont conservées chez les bactéries, les champignons, les plantes et certains animaux invertébrés mais font défaut chez les vertébrés. Les gènes *MEP-AMT* se retrouvent en de multiples exemplaires chez de nombreux organismes, notamment chez les végétaux, comme par exemple chez le peuplier *Populus trichocarpa* qui en compte 16. Les protéines Rh sont, en revanche, présentes dans une grande partie du monde eucaryote, depuis les plus primitifs, tels que les cionnes⁵, les nématodes ou les éponges, jusqu'à l'homme [7]. Des études plus récentes révèlent leur présence également chez un nombre limité de bactéries, dont certaines sont dites nitrifiantes, qui pourraient avoir acquis les gènes *RH* par transfert horizontal⁶ [8]. Enfin, soulignons que, chez certains organismes primitifs, tels que la cione, le nématode ou l'amibe, coexistent à la fois des protéines Mep-Amt et Rh [7]. Les membres de ces deux familles pourraient donc avoir acquis des spécificités au cours de l'évolution.

Fonctions et rôles physiologiques des protéines Mep-Amt : les enseignements de la levure

La levure *S. cerevisiae*, et en particulier un mutant dépourvu de ses transporteurs d'ammonium endogènes, est souvent utilisée comme outil pour l'expression hétérologue de protéines Mep-Amt-Rh en vue de leur caractérisation fonctionnelle, notamment pour tester la fonction de variants mutés de facteurs Rhésus humains qui sont associés à certaines maladies [45] (→).

Chez *S. cerevisiae*, le transport majeur d'ammonium fait intervenir trois protéines : Mep1, Mep2 et Mep3. Ces trois protéines diffèrent par leur

(→) Voir la Nouvelle de M. Filteau et al., page 332 de ce numéro

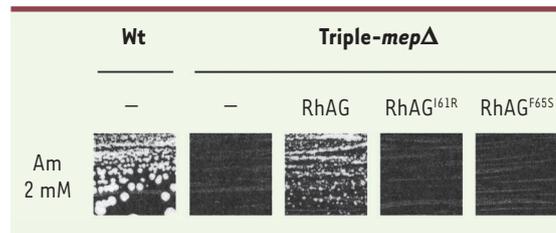


Figure 1. La protéine humaine RhAG est capable d'assurer un transport d'ammonium dans la levure, contrairement à ses variants mutés associés à la stomatocytose avec hématies hyperhydratées (OHS). Test de croissance réalisé avec des levures *S. cerevisiae* en milieu solide contenant comme seule source azotée, de l'ammonium à la concentration de 2 mM (Am 2 mM). Les levures sauvages (Wt) sont capables de croître en présence d'ammonium, contrairement aux cellules dépourvues de leurs transporteurs d'ammonium endogènes (triple-mepΔ). L'expression du gène humain *RHAG* restaure la croissance des levures triple-mepΔ en présence d'ammonium, contrairement à l'expression des variants mutés (RhAG^{I61R}, RhAG^{F65S}), indiquant que ces mutations, correspondant à des polymorphismes non synonymes, affectent la fonction de transport d'ammonium de RhAG (d'après Deschuyteneer et al. [16], avec la permission de PLoS One).

capacité à transporter leur substrat ainsi que par leur affinité pour celui-ci. Une souche de levure dépourvue des trois gènes *MEP*, appelée triple-mepΔ, est incapable de croître en présence d'une concentration d'ammonium inférieure à 5 mM (pH 6,1) comme unique source d'azote [9] (Figure 1). Cependant, chaque gène *MEP*, exprimé indépendamment, permet la croissance dans ces conditions.

Si les transporteurs d'ammonium jouent un rôle évident dans le transport de ce composé en vue de son utilisation comme source d'azote, ils participent également à la croissance en l'absence d'apport d'ammonium exogène [9, 10]. En présence de diverses sources azotées comme l'arginine, de l'ammonium provenant de leur catabolisme est excrété dans l'environnement. Il est alors repompé par les protéines Mep. Cette recapture de l'ammonium et donc ses transporteurs sont primordiaux pour la croissance en présence de certaines sources azotées (citrulline, phénylalanine) comme le souligne l'altération de la croissance, sur ces milieux, des levures triple-mepΔ qui en sont dépourvues. L'éventuelle fonction physiologique de l'excrétion de l'ammonium demeure inconnue. Il a été néanmoins proposé que des vagues d'excrétion d'ammonium par les levures seraient utilisées entre les colonies comme signal à longue distance afin de communiquer une carence nutritionnelle potentielle à venir [11].

⁴ *Saccharomyces cerevisiae* est une levure, un eucaryote unicellulaire appartenant au règne des champignons (ou mycètes). Levure de bière, levure de boulanger ou levure à vin, elle entre dans différents processus de fabrication de produits alimentaires. C'est également un organisme modèle très utilisé en biologie moléculaire et en génétique.

⁵ Une espèce d'ascidie, animal marin.

⁶ Le transfert horizontal de gènes est un processus dans lequel un organisme intègre du matériel génétique provenant d'un autre organisme sans en être le descendant.

Gènes	Expression tissulaire	Pathologies associées
<i>RHAG</i>	Globules rouges	Rh _{null} , stomatocytose avec hématies hyperhydratées (OHSt)
<i>RHCE</i>	Globules rouges	Rh _{null}
<i>RHD</i>	Globules rouges	Rh _{null} , maladie hémolytique du nouveau-né
<i>RHBG</i>	Rein, foie, peau, glandes sudoripares, tube digestif, ovaires	-
<i>RHCG</i>	Rein, cerveau, testicule, placenta, muscles squelettiques, foie, tube digestif, pancréas, prostate	-

Tableau 1. Les gènes RH humains, leur expression tissulaire et le lien avec des pathologies connues. D'après Nakhoul et Lee Hamm [13].

Mep2, et ses orthologues, ont été également décrits comme étant des senseurs nécessaires à la croissance filamenteuse des levures, un changement dimorphique caractéristique des champignons et défini par un bourgeonnement unipolaire et la formation de pseudohyphes⁷ en milieu solide [10, 12]. Chez certains champignons pathogènes, comme *Candida albicans* qui peut provoquer de graves infections chez les patients immunodéprimés, les formes filamenteuses semblent déterminantes pour la virulence. Le mécanisme de signalisation, qui se révèle intimement lié à la fonction de transport et à travers lequel agissent ces transporteurs d'ammonium afin d'induire la filamentation, reste néanmoins inconnu.

Fonctions et rôles physiologiques des protéines Rh

Le système Rhésus tient son nom du singe macaque rhésus, sur lequel les premières expériences de recherche sur le sang ont été réalisées à la fin des années 1930. La fonction intrinsèque des antigènes Rh est restée insoupçonnée jusqu'à la découverte de leur homologie avec des transporteurs d'ammonium. Les antigènes Rhésus étaient auparavant exclusivement connus dans le cadre des problèmes qu'ils peuvent engendrer lors d'une transfusion sanguine, lorsque des individus Rh⁻ reçoivent du sang d'individus Rh⁺.

Les cinq gènes *RH* humains peuvent être divisés en deux catégories selon leur profil d'expression tissulaire : les érythroïdes, *RHAG*, *RHD* et *RHCE*, et les non-érythroïdes, *RHBG* et *RHCG* (Tableau 1). Les protéines RhAG, RhD et RhCE, représentant une cinquantaine d'antigènes indépendants, forment un complexe à la surface des globules rouges et constituent le système du groupe sanguin Rhésus. La délétion du gène *RHD* à l'état homozygote détermine le phénotype Rh⁻ (en opposition au phénotype Rh⁺), conduisant à l'absence de protéines RhD au niveau de la membrane de l'érythrocyte. Lorsqu'une femme Rh⁻ donne naissance à un bébé Rh⁺, elle risque de développer une réponse immunitaire conduisant à la production d'anticorps dirigés contre la protéine RhD. Lors d'une seconde grossesse, ces anticorps anti-RhD pourront reconnaître et attaquer les érythrocytes du nouveau bébé. Cette réaction correspond à la maladie hémolytique du nouveau-né qui peut être prévenue en injectant des immunoglobulines anti-RhD, peu de temps après l'accouchement.

Plus rarement, le phénotype « Rh null » est également observé. Il est caractérisé par une absence de RhAG, RhD et RhCE à la surface des globules rouges et engendre des anémies hémolytiques.

Contrairement à ceux des gènes *RHAG*, *RHD* et *RHCE*, les transcrits des gènes *RHBG* et *RHCG* sont complètement absents dans les globules rouges. Ils ont été détectés dans certains organes tels que le rein, le foie, le cerveau, le tube digestif, le pancréas ou les organes reproducteurs [13] (Tableau 1). Les transcrits *RHCG* et *RHBG* sont notamment abondamment détectés dans le rein. Alors que RhBG est décrit comme situé exclusivement au niveau basolatéral, RhCG est localisé au niveau des membranes basolatérale et/ou apicale des cellules des tubes collecteurs des néphrons. Le foie est aussi un site majeur d'expression de *RHBG* ; la protéine se localise au niveau de la membrane des hépatocytes périverneux qui sont impliqués dans la détoxification de l'ammonium en glutamine, par action de la glutamine synthétase.

En accord avec leur lien de parenté avec les protéines Mep-Amt, l'expression hétérologue de protéines Rh humaines dans les levures déficientes pour le transport d'ammonium montre que ces protéines sont capables d'assurer le transport bidirectionnel de l'ammonium dans cet organisme [14] (Figure 1). Des études testant l'invalidation du gène *RHcg* chez la souris ont conforté l'hypothèse de la fonction des Rh en tant que systèmes de transport de l'ammonium [44] (→).

(→) Voir la Nouvelle de J.P. Cartron, *m/s* n° 4, avril 2005, page 344

En effet, l'invalidation de *RHcg* conduit à une nette réduction de l'excrétion d'ammonium dans l'urine, déjà en condition basale, mais qui est d'autant plus marquée en condition de charge acide [15]. L'invalidation de *RHcg* entraîne une acidose métabolique, une caractéristique d'une pathologie humaine appelée dRTA pour acidose tubulaire rénale distale. De plus, *RHcg*, également exprimé dans les cellules épithéliales de l'épididyme, joue un rôle dans l'homéostasie du pH du fluide épидидymal ainsi que dans la fertilité des souris mâles.

⁷ Les pseudohyphes sont formés suite à un changement dimorphique des cellules diploïdes, caractérisé par un bourgeonnement unipolaire et l'absence de séparation des cellules filles.

Plusieurs variants génétiques des gènes *RH* ont été identifiés chez l'homme. Ainsi un polymorphisme de RhCG correspondant à la mutation R202C conduit à une altération de la capacité de la protéine à transporter l'ammonium dans les levures [16]. Une réduction de la fonctionnalité de RhCG chez les individus portant cette mutation pourrait être à l'origine de troubles menant à une acidose métabolique, comme cela est observé chez les souris invalidées pour *RHcg*. Ce défaut pourrait également altérer le processus de détoxification de l'ammonium. RhCG pourrait donc constituer un gène candidat pour les formes héréditaires d'acidose tubulaire rénale distale (dRTA). Des mutations ponctuelles situées dans le gène *RHAG* ont été par ailleurs trouvées chez des patients atteints de stomatocytose avec hématies hyperhydratées (OHSt), une maladie dominante héréditaire caractérisée par une fuite abondante de cations monovalents à travers la membrane érythrocytaire [17]. L'expression hétérologue de ces versions mutées de *HsRHAG* dans les levures indique que les protéines correspondantes présentent effectivement une altération de leur fonction de transport de l'ammonium [16] (Figure 1).

Substrats et mécanismes de transport des protéines Mep-Amt-Rh

Le mécanisme de transport et la nature chimique précise du substrat transloqué par les protéines Mep-Amt-Rh restent des sujets très controversés dans la littérature. Alors que certains auteurs avancent que les protéines Mep-Amt sont des canaux à NH_3 , des études d'électrophysiologie réalisées avec des transporteurs d'ammonium de plantes sont, au contraire, en faveur d'un uniport⁸ de la forme chargée NH_4^+ . Différents mécanismes de transport de l'ammonium pourraient néanmoins coexister au sein d'un même organisme, comme cela a été proposé pour la levure *S. cerevisiae* [18].

La majorité des membres actuels de la famille Mep-Amt ont une structure formée de 11 segments transmembranaires, une extrémité N-terminale extracellulaire et une extrémité C-terminale intracellulaire. Cependant, certains membres bactériens présentent un segment hydrophobe supplémentaire, situé du côté N-terminal. C'est notamment le cas de la protéine AmtB d'*Escherichia coli* chez laquelle le segment additionnel est un peptide signal clivable [19]. Les données cristallographiques recueillies à partir de protéines Amt bactériennes révèlent une association trimérique avec, pour chaque monomère, un vestibule extracellulaire de recrutement du NH_4^+ , un long canal hydrophobe et un vestibule cytoplasmique [20-22]. Il est proposé que la forme NH_4^+ soit la forme reconnue tandis que ce serait la forme neutre NH_3 qui traverse le pore hydrophobe. Ceci souligne la nécessité d'une étape de déprotonation préalable. La forme neutre NH_3 qui traverse le canal hydrophobe serait ensuite reprotonée du côté intracellulaire. Les membres de la famille Rh seraient structurés en 12 segments transmembranaires, bien que la protéine Rh50 de la bactérie *Nitrosomonas europaea* ait été, elle, cristallisée dans une configuration à 11 segments transmembranaires [23, 24]. Les structures cristallines des protéines

Rh50 de *N. europaea* [23, 24] et RhCG humaine [25] sont très similaires à celles des Amt cristallisées. Cependant, en accord avec la plupart des études électrophysiologiques indiquant un transport électroneutre par les protéines Rh [26-28], les données cristallographiques suggèrent une reconnaissance et une translocation de la forme neutre NH_3 . Un dernier point de controverse concerne le rôle que pourraient jouer les protéines Rh dans le transport d'un autre composé diffusible, le CO_2 [29, 30].

Régulation des transporteurs d'ammonium bactériens

Les gènes *MEP-AMT* procaryotiques font partie presque invariablement d'un opéron dicistronique⁹ qui comprend également le gène *GLNK*. La protéine GlnK est un homologue des protéines de type P_{II} qui sont des régulateurs du métabolisme azoté présents majoritairement chez les procaryotes. GlnK apparaît comme le principal régulateur, en fonction du statut azoté cellulaire, d'AmtB, la protéine bactérienne Mep-Amt la mieux caractérisée et unique transporteur d'ammonium d'*E. coli* (Figure 2). Alors qu'en condition limitée en azote, GlnK est cytosolique et uridylylé, l'ajout d'ammonium dans le milieu induit sa déuridylylation, sa relocalisation à la membrane plasmique et son interaction avec AmtB [31]. Les données cristallographiques montrent qu'un trimère d'AmtB s'associe physiquement du côté cytoplasmique à un trimère de GlnK [32, 33]. La longue boucle T¹⁰ de GlnK permet à l'arginine située en position 47 de s'insérer profondément dans le vestibule cytoplasmique du monomère d'AmtB qui est contigu de celui auquel GlnK est associé. En réalisant des liaisons de faible affinité (des ponts hydrogènes et/ou des interactions de Van der Waals), l'arginine 47 de GlnK interagit avec divers acides aminés du canal, excluant ainsi totalement le passage du NH_3 à travers le pore. GlnK présente une activité ATPasique qui est inhibée par l' α -cétoglutarate [34], un intermédiaire du cycle de Krebs et un indicateur du statut azoté. Lors d'une suffisance en azote, la perte de liaison d' α -cétoglutarate s'accompagne de l'hydrolyse de l'ATP, menant à un changement conformationnel de la boucle T de GlnK. GlnK se fixant à AmtB, la boucle T de la protéine régulatrice est ainsi potentiellement capable de s'insérer dans le pore du transporteur AmtB contigu et de l'inactiver.

⁹ Un opéron est un groupe de gènes soumis au même promoteur et donc transcrits en même temps. Ces gènes codent pour des protéines dont les fonctions sont apparentées. Un opéron dicistronique est à l'origine de la production de deux protéines à partir d'un ARN messenger unique.

¹⁰ Chaque monomère de GlnK comprend 2 hélices α et 4 brins β arrangés de façon telle qu'ils forment un double motif $\beta\alpha\beta$ connecté par une large boucle de 19 acides aminés. Cette boucle a été désignée boucle T car elle a été caractérisée pour la première fois chez la protéine GlnK d'*E. coli* et elle contient un résidu tyrosine en position 51 (T) qui est sujet à l'uridylylation.

⁸ Une protéine uniport est une protéine de transport qui ne permet le passage que d'un seul type de molécule dans une seule direction (le long du gradient électrochimique) à travers la membrane de la cellule.

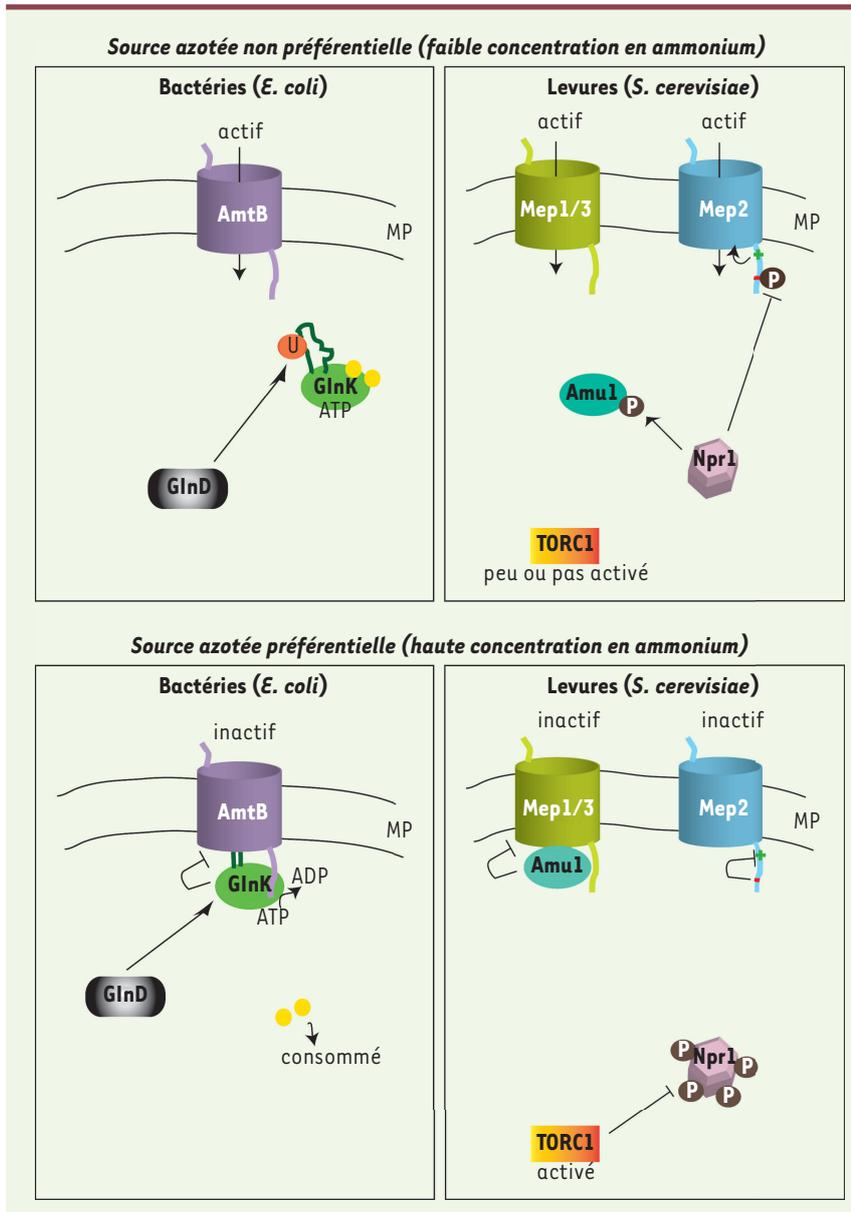


Figure 2. Modèles de la régulation des protéines Mep-Amt bactériennes et fongiques.

Exemples d'AmtB d'*Escherichia coli* et Mep1, Mep2 et Mep3 de *Saccharomyces cerevisiae*. En haut à gauche, *E. coli* : en présence d'une source d'azote non préférée, telle qu'une limitation en ammonium, la réserve d' α -cétoglutarate (boules jaunes) est conséquente. Celui-ci se fixe à GlnK ce qui inhibe l'hydrolyse de l'ATP, la boucle T de la protéine (en vert foncé) adopte alors une structure flexible. Dans le même temps, GlnD uridylyle GlnK au niveau de la boucle T. Dans ces conditions, GlnK demeure cytosolique et AmtB est actif. En haut à droite, *S. cerevisiae* : en présence d'une source d'azote non préférée, TORC1 (*target of rapamycin complex*) est peu actif et la kinase Npr1 est hypophosphorylée et active. L'activation de Npr1 conduit à la phosphorylation d'Amu1 qui demeure cytosolique ce qui permet à Mep1 et Mep3 de rester actifs. Npr1 provoque aussi la phosphorylation de Mep2 au niveau d'un domaine C-terminal inhibiteur (-) de l'activité. Ce domaine étant inhibé, le domaine C-terminal activateur (+) de Mep2 peut activer le transport. En bas à gauche, *E. coli* : lors d'une suffisance en azote, l' α -cétoglutarate est consommé suite à l'assimilation de la source azotée et son niveau intracellulaire chute. La perte d' α -cétoglutarate lié à GlnK provoque l'hydrolyse de l'ATP, menant à un changement conformationnel de la boucle T qui devient plus rigide. Dans le même temps, GlnK est déuridylylé par GlnD. Dans ces conditions, GlnK rejoint la surface cellulaire et inhibe l'activité d'AmtB en insérant sa longue boucle T dans le

pore de celui-ci. En bas à droite, *S. cerevisiae* : en présence d'une source azotée préférée, TORC1 est activé, la kinase Npr1 est hyperphosphorylée et inactive. Amu1 est alors déphosphorylé et s'accumule à la surface cellulaire où il interagit physiquement avec Mep1 et Mep3, ce qui inhibe leur capacité à transporter l'ammonium. En outre, le domaine de régulation négative (-) de Mep2 n'est pas phosphorylé et est libre d'inhiber l'action du domaine de régulation positive (+), Mep2 est donc inactif. MP : membrane plasmique ; U : groupement uridylyl ; P : groupement phosphate ; Amu1 : ammonium uptake 1 ; GlnD : bifunctional uridylyltransferase/uridylyl-removing enzyme ; Npr1 : nitrogen permease reactivator 1.

Régulation des transporteurs d'ammonium de *S. cerevisiae*

La régulation des protéines Mep-Amt de *S. cerevisiae* a également été le sujet de plusieurs études. Les gènes *MEP* sont soumis à la répression catabolique azotée, appelée NCR (*nitrogen catabolite repression*) [9]. Il s'agit d'un contrôle de la transcription des gènes qui sont impliqués dans le transport et l'utilisation de sources non préférées d'azote. Ces gènes sont exprimés en présence d'une source d'azote non préférée (comme la proline, l'urée, ou les faibles concentrations en ammonium) et réprimés en présence

d'une source d'azote préférée (représentée par la glutamine ou de fortes concentrations en ammonium).

Des études s'intéressant à l'oligomérisation des protéines Mep-Amt montrent que leur extrémité C-terminale participe à leur régulation d'activité. En effet, la substitution par un aspartate d'une glycine C-terminale conservée rend le transporteur Mep1 intrinsèquement inactif et également capable de trans-inhiber l'activité de protéines Mep1 et Mep3 natives. Ce phénomène a également été observé pour

Mep3 ainsi que pour d'autres transporteurs d'ammonium de champignons ou de plantes [35-38]. Par ailleurs, chez la plante *Arabidopsis thaliana*, l'extrémité C-terminale de la protéine Amt1;1 joue aussi un rôle de régulateur allostérique de l'activité du transporteur, un monomère pouvant trans-activer le monomère voisin [37].

Deux études récentes ont révélé les détails d'un mécanisme de régulation post-traductionnelle des protéines Mep de *S. cerevisiae*. Il fait intervenir la sérine/thréonine kinase Npr1 (*nitrogen permease reactivator 1*) et la voie de signalisation conservée TORC1 (*target of rapamycin complex 1*), connue pour réguler la croissance cellulaire en intégrant des signaux environnementaux comme la disponibilité en nutriments [39, 40] (Figure 2). La kinase Npr1, effecteur de la voie TORC1, et la protéine Npr2, régulateur situé en amont de TORC1, contrôlent l'activité de transport de Mep2 par phosphorylation d'un domaine inhibiteur de l'activité qui est situé dans la région C-terminale du transporteur [39]. En présence d'une source d'azote non préférentielle, Npr1 permet la phosphorylation de la sérine située en position 457 de Mep2, ce qui préserve l'activité du transporteur. L'ajout d'une source préférentielle d'azote, comme l'ammonium à hautes concentrations, provoque l'inactivation TORC1-dépendante par phosphorylation de la kinase Npr1 qui est suivie de la déphosphorylation instantanée de la sérine 457 de Mep2 par des phosphatases de la membrane plasmique, Psr1 et Psr2, ainsi que de l'inactivation rapide du transporteur. Bien que Mep1 et Mep3 apparaissent également régulées par Npr1 et TORC1, le mécanisme de régulation de ces protéines est différent de celui contrôlant Mep2 [40]. En effet, un régulateur négatif de Mep1 et Mep3 a récemment été décrit. Il s'agit d'Amu1 (*ammonium uptake 1*), une protéine dont la fonction demeurerait jusqu'alors inconnue. En présence d'une source d'azote non préférentielle, Npr1 induit la phosphorylation d'Amu1 qui est alors essentiellement cytosolique. Mep1 et Mep3 demeurent alors actifs. À la suite de l'ajout d'une source azotée préférentielle, l'inactivation de Npr1, dépendante de TORC1, induit la déphosphorylation d'Amu1 qui s'accumule alors à la surface de la cellule et conduit à l'inhibition de Mep1 et Mep3 par interaction directe. Cette liaison d'Amu1 à Mep1 et Mep3 nécessite l'intégrité d'un motif conservé et répété 4 fois au sein de la protéine Amu1. Il a été proposé qu'Amu1, conservé uniquement chez les champignons, puisse être un analogue fonctionnel du régulateur bactérien GlnK.

Régulation des facteurs Rh

La régulation des protéines Rh a jusqu'ici été peu abordée dans la littérature. D'un point de vue transcriptionnel, il a été montré que le gène *RHBG* se trouve exprimé dans les hépatocarcinomes et que son expression dépend de la voie impliquant la β -caténine, une voie fréquemment dérégulée dans certains cancers [41].

Les mécanismes de la régulation post-traductionnelle des protéines Mep-Amt bactériennes et fongiques semblent conservés, même si les protéines inhibitrices qu'ils impliquent, GlnK et Amu1, sont structurellement différentes. Un mécanisme de régulation similaire pourrait également exister pour les protéines Rh. Un analogue fonctionnel d'Amu1 et GlnK reste toutefois à mettre en évidence.

Chez les animaux, les protéines Rh, notamment RhCG, pourraient jouer un rôle important dans le contrôle du pH des fluides. De manière inté-

ressante, RhAG, au niveau des globules rouges, et RhBG, au niveau des cellules rénales intercalaires, forment un complexe avec l'échangeur d'anions $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$, AE1 (*anion exchanger 1*, ou Band3), et avec l'ankyrine [42, 43]. Il a été proposé qu'au niveau des érythrocytes, le macrocomplexe protéique comprenant RhAG fonctionnerait comme un métabolon¹¹ impliqué dans l'échange de gaz CO_2/O_2 [42]. Au niveau rénal, le complexe RhBG/ankyrine/AE1 pourrait, lui, être impliqué dans l'homéostasie acide/base en excréant de l'ammonium ou des protons dans l'urine [43]. L'interaction à l'ankyrine G semble essentielle à la fonction de RhBG, suggérant une régulation entre les membres de ces macrocomplexes.

Conclusions

L'ammonium joue de multiples rôles dans le monde vivant. Il peut servir de source azotée, de régulateur de pH mais peut également se révéler cytotoxique. Les protéines assurant son transport sont présentes chez la plupart des organismes. Chez les champignons, en présence d'ammonium, les orthologues de Mep2 sont essentiels pour la filamentation, une transformation morphologique déterminante pour la virulence de certains pathogènes fongiques comme *Candida albicans*.

La levure apparaît comme un outil simple et adéquat pour tester la fonctionnalité des transporteurs d'ammonium Mep-Amt bactériens, fongiques ou végétaux, mais également les Rh animaux. De nombreux polymorphismes non synonymes ont été identifiés dans les gènes *RH* humains et la fonctionnalité de ces variants RhCG et RhAG peut être aisément testée en les exprimant dans les levures, comme cela a été réalisé pour des variants de RhAG recensés chez des patients souffrant de stomatocytose avec hématies hyperhydratées (OHSt). Même si un défaut dans le transport d'ammonium pourrait être observé pour d'autres variants, aucune pathologie n'y a encore été associée.

Les protéines Rh sont produites dans de nombreux organes dans lesquels leur rôle ainsi que celui de leur substrat restent à définir plus précisément. L'implication potentielle que peuvent avoir les protéines Rh dans le développement du cancer est également un sujet à investiguer. L'ammonium provenant de la glutaminolyse massive semble en effet intervenir dans la prolifération des cellules cancéreuses. Contrôler l'activité des protéines Mep-Amt-Rh pourrait offrir la possibilité de réguler les processus qui altèrent l'accumulation d'ammonium, la régulation du pH, la communication entre cellules et potentiellement la prolifération tumorale. \diamond

¹¹ Complexe protéique transitoire formé d'enzymes et de protéines de structure impliqués dans un même processus cellulaire.

SUMMARY

From the discovery of microbial Mep-Amt ammonium transporters to human Rhesus factors

Ammonium, ubiquitous on Earth, plays major and distinct roles in most organisms. While it can be a nitrogen source for many microorganisms and plants, it is a cytotoxic metabolic product actively detoxified by the liver in animals. Furthermore, in the latter, ammonium synthesis in the kidney is involved in acid/base homeostasis. Ammonium transport is ensured by a family of proteins, called Mep-Amt-Rh. This family is conserved in all domains of life and comprises the human Rh factors, notably known in transfusional medicine. While the study of bacterial, fungal and vegetal Mep-Amt transporters reveals a fine-tuned and rapid regulation of these proteins in function of environmental changes, the regulation of animal Rh proteins has been poorly addressed. This review notably highlights the importance of the yeast model in the study of the regulation of these proteins as well as in the functional characterization of Mep-Amt-Rh members of diverse origins. ♦

LIENS D'INTÉRÊT

L'auteur déclare n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

1. Auron A, Brophy PD. Hyperammonemia in review: pathophysiology, diagnosis, and treatment. *Pediatr Nephrol* 2012 ; 27 : 207-22.
2. Weiner ID, Verlander JW. Renal ammonia metabolism and transport. *Compr Physiol* 2013 ; 3 : 201-20.
3. Eng CH, Yu K, Lucas J, et al. Ammonia derived from glutaminolysis is a diffusible regulator of autophagy. *Sci Signal* 2010 ; 3 : ra31.
4. Dubois E, Grenson M. Methylamine/ammonia uptake systems in *Saccharomyces cerevisiae*: multiplicity and regulation. *Mol Gen Genet* 1979 ; 175 : 67-76.
5. Marini AM, Vissers S, Urrestarazu A, et al. Cloning and expression of the MEP1 gene encoding an ammonium transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* 1994 ; 13 : 3456-63.
6. Ninemann O, Jauniaux JC, Frommer WB. Identification of a high affinity NH₄⁺ transporter from plants. *EMBO J* 1994 ; 13 : 3464-71.
7. Marini AM, Urrestarazu A, Beauwens R, et al. The Rh (rhesus) blood group polypeptides are related to NH₄⁺ transporters. *Trends Biochem.* 1997 ; 22 : 460-1.
8. Huang CH, Peng J. Evolutionary conservation and diversification of Rh family genes and proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005 ; 102 : 15512-7.
9. Marini AM, Soussi-Boudekou S, Vissers S, et al. A family of ammonium transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 1997 ; 17 : 4282-93.
10. Boeckstaens M, Andre B, Marini AM. The yeast ammonium transport protein Mep2 and its positive regulator, the Npr1 kinase, play an important role in normal and pseudohyphal growth on various nitrogen media through retrieval of excreted ammonium. *Mol Microbiol* 2007 ; 64 : 534-46.
11. Rafael S, Palkova Z, Janderova B, et al. Ammonia mediates communication between yeast colonies. *Nature* 1997 ; 390 : 532-6.
12. Lorenz MC, Heitman J. The MEP2 ammonium permease regulates pseudohyphal differentiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* 1998 ; 17 : 1236-47.
13. Nakhoul NL, Lee Hamm L. Characteristics of mammalian Rh glycoproteins (SLC42 transporters) and their role in acid-base transport. *Mol Aspects Med* 2013 ; 34 : 629-37.
14. Marini AM, Matassi G, Raynal V, et al. The human Rhesus-associated RhAG protein and a kidney homologue promote ammonium transport in yeast. *Nat Genet* 2000 ; 26 : 341-4.
15. Biver S, Belge H, Bourgeois S, et al. A role for Rhesus factor Rhcg in renal ammonium excretion and male fertility. *Nature* 2008 ; 456 : 339-43.
16. Deschuyteneer A, Boeckstaens M, De Mees C, et al. SNPs altering ammonium transport activity of human Rhesus factors characterized by a yeast-based functional assay. *PLoS One* 2013 ; 8 : e71092.
17. Bruce LJ, Guizouarn H, Burton NM, et al. The monovalent cation leak in overhydrated stomatocytic red blood cells results from amino acid substitutions in the Rh-associated glycoprotein. *Blood* 2009 ; 113 : 1350-7.
18. Boeckstaens M, Andre B, Marini AM. Distinct transport mechanisms in yeast ammonium transport/sensor proteins of the mep/amt/rh family and impact on filamentation. *J Biol Chem* 2008 ; 283 : 21362-70.
19. Thornton J, Blakey D, Scanlon E, et al. The ammonia channel protein AmtB from *Escherichia coli* is a polytopic membrane protein with a cleavable signal peptide. *FEMS Microbiol Lett* 2006 ; 258 : 114-20.
20. Khademi S, O'Connell III J, Remis J, et al. Mechanism of ammonia transport by Amt/MEP/Rh: structure of AmtB at 1.35 Å. *Science* 2004 ; 305 : 1587-94.
21. Zheng L, Kostrewa D, Berneche S, et al. The mechanism of ammonia transport based on the crystal structure of AmtB of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004 ; 101 : 17090-5.
22. Andrade SL, Dickmanns A, Ficner R, et al. Crystal structure of the archaeal ammonium transporter Amt-1 from *Archaeoglobus fulgidus*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005 ; 102 : 14994-9.
23. Lupo D, Li XD, Durand A, et al. The 1.3-Å resolution structure of *Nitrosomonas europaea* Rh50 and mechanistic implications for NH₃ transport by Rhesus family proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007 ; 104 : 19303-8.
24. Li X, Jayachandran S, Nguyen H-HT, et al. Structure of the *Nitrosomonas europaea* Rh protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007 ; 104 : 19279-84.
25. Gruswitz F, Chaudhary S, Ho JD, et al. Function of human Rh based on structure of RhCG at 2.1 Å. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010 ; 107 : 9638-43.
26. Ludewig U. Electroneutral ammonium transport by basolateral rhesus B glycoprotein. *J Physiol* 2004 ; 559 : 751-9.
27. Ludewig U. Ion transport versus gas conduction: function of AMT/Rh-type proteins. *Transfus Clin Biol* 2006 ; 13 : 111-6.
28. Mak DO, Dang B, Weiner ID, et al. Characterization of ammonia transport by the kidney Rh glycoproteins RhBG and RhCG. *Am J Physiol Ren Physiol* 2006 ; 290 : F297-305.
29. Boron WF. Sharpey-Schafer lecture: gas channels. *Exp Physiol* 2010 ; 95 : 1107-30.
30. Geyer RR, Parker MD, Toye AM, et al. Relative CO₂/NH₃ permeabilities of human RhAG, RhBG and RhCG. *J Membr Biol* 2013 ; 246 : 915-26.
31. Coutts G, Thomas G, Blakey D, et al. Membrane sequestration of the signal transduction protein GlnK by the ammonium transporter AmtB. *EMBO J* 2002 ; 21 : 536-45.
32. Gruswitz F, O'Connell III J, Stroud RM. Inhibitory complex of the transmembrane ammonia channel, AmtB, and the cytosolic regulatory protein, GlnK, at 1.96 Å. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007 ; 104 : 42-7.
33. Conroy MJ, Durand A, Lupo D, et al. The crystal structure of the *Escherichia coli* AmtB-GlnK complex reveals how GlnK regulates the ammonia channel. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007 ; 104 : 1213-8.
34. Radchenko M V, Thornton J, Merrick M. P(II) signal transduction proteins are ATPases whose activity is regulated by 2-oxoglutarate. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013 ; 110 : 12948-53.
35. Monahan BJ, Unkles SE, Tsing IT, et al. Mutation and functional analysis of the *Aspergillus nidulans* ammonium permease MeaA and evidence for interaction with itself and MepA. *Fungal Genet Biol* 2002 ; 36 : 35-46.
36. Ludewig U, Wilken S, Wu B, et al. Homo- and hetero-oligomerization of ammonium transporter-1 NH₄⁺ uniporters. *J Biol Chem* 2003 ; 278 : 45603-10.
37. Loqué D, Lalonde S, Looger LL, et al. A cytosolic trans-activation domain essential for ammonium uptake. *Nature* 2007 ; 446 : 195-8.
38. Neuhäuser B, Dynowski M, Mayer M, et al. Regulation of NH₄⁺ transport by essential cross talk between AMT monomers through the carboxyl tails. *Plant Physiol* 2007 ; 143 : 1651-9.
39. Boeckstaens M, Llinares E, Vooren P Van, et al. The TORC1 effector kinase Npr1 fine tunes the inherent activity of the Mep2 ammonium transport protein. *Nat Commun* 2014 ; 5 : 3101.
40. Boeckstaens M, Merhi A, Llinares E, et al. Identification of a novel regulatory mechanism of nutrient transport controlled by TORC1-Npr1-Amu1/Par32. *PLoS Genet* 2015 ; 11 : e1005382.
41. Merhi A, De Mees C, Abdo R, et al. Wnt/β-catenin signaling regulates the expression of the ammonium permease gene RHBG in human cancer cells. *PLoS One* 2015 ; 10 : e0128683.
42. Bruce LJ, Beckmann R, Ribeiro ML, et al. A band 3-based macrocomplex of integral and peripheral proteins in the RBC membrane. *Blood* 2003 ; 101 : 4180-8.
43. Genetet S, Ripoche P, Le Van Kim C, et al. Evidence of a structural and functional ammonium transporter RhBG-anion exchanger 1-ankyrin-G complex in kidney epithelial cells. *J Biol Chem* 2015 ; 290 : 6925-36.
44. Cartron JP. Protéines de la famille Rh et transport membranaire du gaz NH₃. *Med Sci (Paris)* 2005 ; 21 : 344-6.
45. Filteau M, Hamel V, Landry CR. La levure à vin modèle d'étude des gènes et des maladies humaines dans un contexte personnalisé. *Med Sci (Paris)* 2016 ; 32 : 332-4.

TIRÉS À PART

M. Boeckstaens