

# Gradients ioniques et transport membranaire

**L**a membrane plasmique de toute cellule est le siège de nombreux processus de transport qui permettent soit l'entrée dans la cellule de substances nécessaires à son métabolisme, soit la sortie de la cellule de produits d'exportation ou de déchets. On distingue d'une part des transports passifs, c'est-à-dire ne consommant pas d'énergie (comme la diffusion simple ou la diffusion facilitée) et des transports actifs, c'est-à-dire consommant de l'énergie. Parmi les transports actifs, certains (dits transports actifs primaires) sont directement liés à la source d'énergie qui est, le plus souvent, dans nos cellules, l'ATP : c'est le cas du transport actif du  $\text{Na}^+$  par la  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase. D'autres (appelés aujourd'hui transports actifs secondaires) ne sont pas directement couplés à la source d'énergie mais tirent l'énergie nécessaire (sont « énergisés ») d'un gradient ionique, lui-même lié généralement à l'activité d'un enzyme. L'hypothèse du couplage du transport d'un substrat à un gradient ionique utilisé comme source d'énergie a été proposée par R. K. Crane il y a une vingtaine d'années. Le prototype d'un tel transport est le transport actif du glucose par l'entérocyte énergisé par le gradient de  $\text{Na}^+$  ( $\text{Na}^+$  extracellulaire élevé,  $\text{Na}^+$  intracellulaire bas) maintenu par la  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase. Un tel mécanisme opère grâce au cotransport (ou symport) du substrat (ici le glucose) et d'un ion  $\text{Na}^+$  entrant dans la cellule le long de son gradient électrochimique. Si la réalité physiologique et l'universalité d'un tel mécanisme ne peuvent plus être mises en doute, il n'en demeure pas moins un certain nombre de questions en quête d'une réponse, comme en témoigne une conférence récente sur le transport

membranaire énergisé par les gradients ioniques, organisée par le Dr G. Semenza pour le compte de l'Académie des Sciences de New York (Barbizon Plaza Hôtel, New York, 2-4 octobre 1984).

Il apparaît tout d'abord que les systèmes énergisés par les gradients ioniques chez les bactéries, dans les cellules isolées et dans les organites cellulaires, bien que fonctionnant sur un principe commun, montrent une grande diversité quant à la nature et au nombre d'ions utilisés pour le co-transport, quant au mécanisme moléculaire de couplage entre ion et substrat et quant à l'enzyme impliqué dans le maintien du gradient électrochimique des ions co-transportés (et dont le gradient sert de source d'énergie).

Il apparaît également que l'unicité d'un système de transport fonctionnant sur le principe d'un couplage énergétique selon la théorie du gradient repose sur la comparaison des accumulations en substrat mesurées *in vivo* et prédites par les lois de la thermodynamique dans les mêmes conditions. Ces deux valeurs dépendent très étroitement du degré de couplage et de la stœchiométrie du couplage entre ion et substrat. Ces deux grandeurs dépendent des techniques d'étude, et la possibilité de deux systèmes de transport de glucose avec des stœchiométries de couplage au  $\text{Na}^+$  différentes est une éventualité à laquelle il faudra faire face dans les analyses futures. Le potentiel de membrane ( $\Delta\Psi$ ) affecte également les taux d'accumulation intracellulaire du soluté. L'étude de l'influence de  $\Delta\Psi$  sur le transport intestinal du glucose couplé au  $\text{Na}^+$  montre une variation exponentielle avec  $\Delta\Psi$ , comportement qui semble réfuter la vision classique de l'existence d'un seuil  $\Delta\Psi$  indispensable au transport et d'un  $\Delta\Psi$  optimal capable de maximiser le transport.

Quelques systèmes de co-transport ont été étudiés plus en détail. Bon nombre d'épithéliums capables de transport actif de  $\text{Cl}^-$  possèdent un système de cotransport  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  dont les caractéristiques sont similaires incluant une stœchiométrie 1 : 1 : 2 et une inhibition par

les drogues diurétiques (furosémide et bumétanide). Toutefois des localisations membranaires respectivement apicale ou basolatérale d'un système identique permettent soit une absorption soit une sécrétion de  $\text{Cl}^-$ . L'échangeur (ou antiport)  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  des membranes microvillositaires des tubules proximaux du rein présente au moins un site allostérique interne qui permet l'activation du système par liaison d'un proton, soulignant un rôle possible dans la régulation du pH intracellulaire. Dans les lymphocytes du thymus de rat, ce système (échange  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ ) peut de plus être stimulé par une réduction du volume cellulaire consécutive à un stress hypertonique. L'insertion asymétrique du transporteur  $\text{Na}^+$ -glucose dans la membrane apicale des entérocytes est accompagnée d'une asymétrie dans les propriétés fonctionnelles, telles que démontrées par les études cinétiques. Il apparaît donc qu'un mode de fonctionnement par rotation à travers la membrane doit être rejeté au profit d'un mouvement à travers un canal (ou un pore). Toutefois, une partie de ce canal doit être mobile pour rendre compte du transport des substrats,  $\text{Na}^+$  et glucose. Un modèle de fonctionnement est proposé dans lequel la liaison du  $\text{Na}^+$  sur cette partie mobile (barrière) modulerait la réponse au potentiel membranaire et rendrait les sites de liaison des substrats accessibles de façon alternative aux deux faces membranaires. Finalement, l'utilisation d'anticorps monoclonaux ou d'inhibiteurs spécifiques permet d'identifier une chaîne peptidique de poids moléculaire 72-75 000 daltons qui répond aux critères nécessaires à son identification avec un co-transporteur  $\text{Na}^+$ -glucose.

La génétique et la régulation des systèmes de transport énergisés par les gradients ioniques ont également été abordés. Par exemple, plusieurs systèmes de transport  $\text{Na}^+$ -dépendant des tubules proximaux de rein semblent contrôlés par différentes hormones et altérés par différents états physiopathologiques. Ou encore les cellules LLC-PK<sub>1</sub>, déri-

vées de l'épithélium rénal de porc, expriment en culture des niveaux de transport  $\text{Na}^+$ -dépendant d'acides aminés et de sucres qui sont inversés pendant la phase exponentielle de croissance et la confluence. D'autres cellules, dérivées d'ovaires de hamsters chinois (cellules CHO), régulent les systèmes A et L de transport des acides aminés neutres selon la disponibilité des acides aminés dans les milieux de culture. Les manipulations génétiques ont permis d'isoler des mutants dont l'activité du système L est augmentée et non régulée ou déficiente en système L. De plus, des hybrides de cellules CHO et de leucocytes humains ont été isolés qui possèdent une activité élevée du transport de leucine, ce qui a permis de démontrer l'association du système L avec le chromosome 20 humain.

En conclusion, ce congrès a permis de présenter les données récentes qui viennent étayer la réalité physiologique et l'universalité de la théorie du gradient. Il resterait toutefois à préciser si les systèmes de co-transport peuvent à eux seuls satisfaire les exigences nutritionnelles de certaines cellules et expliquer les mécanismes d'homéostasie tels la régulation du volume ou du pH intracellulaires. D'autre part, s'il est hors de doute que les fonctions de transport couplé aux ions sont assurées par des protéines codées par des gènes spécifiques, il apparaît que l'aspect régulation n'a encore été que très peu exploré. On peut toutefois prédire un développement très rapide en ce domaine au cours des prochaines années, par l'introduction des techniques biotechnologiques. Finalement, les mécanismes moléculaires du fonctionnement se résument essentiellement à des modèles de travail dont la nature biochimique et physicochimique restent à déterminer. On peut également prédire un développement rapide dans ce domaine avec les succès obtenus dans la purification de certaines protéines dont l'identification avec le transporteur ou une partie de celui-ci semble probable. A. B.

## Le clonage du Facteur antihémophilique A

**D**ans le numéro de *Nature* du 22 novembre 1984, quatre articles décrivaient le clonage du Facteur antihémophilique A humain ou Facteur VIII C, et son expression dans des lignées de cellules de mammifères. Cette réalisation, la plus ambitieuse de la biotechnologie à ce jour, est à mettre au crédit de deux compagnies américaines : Genentech, aidée par des chercheurs du Royal Free Hospital de Londres, et Genetic Institute, avec des chercheurs de la Mayo Clinic.

Le déficit en Facteur VIII C est la cause de l'hémophilie A, qui atteint environ 20 sujets de sexe masculin sur 100 000. Les fractions plasmatiques enrichies en Facteur VIII en sont une thérapeutique efficace. Mais, en dehors de leur coût élevé, leur injection fréquemment répétée entraîne un risque de transmission de certains virus d'hépatite et du SIDA. C'est dire avec quel enthousiasme serait accueillie une source de Facteur VIII totalement exempte de ces risques.

Dans la technique choisie par chacun des deux groupes, la stratégie du clonage exigeait la possession de protéine antihémophilique pure. Or celle-ci n'existe qu'en quantités infimes dans le plasma (200 microgrammes par litre). On a cependant réussi à la purifier grâce à l'emploi d'anticorps monoclonaux. On a analysé la séquence en

acides aminés de petits fragments de la protéine. En appliquant les données du code génétique, on en a déduit la séquence la plus probable de la partie correspondante du gène et on a synthétisé chimiquement des chaînes contenant de 15 à 50 nucléotides. Dans des conditions techniques précises, ces séquences peuvent s'apparier (on dit s'hybrider) avec des portions du gène lui-même. On a ainsi identifié des séquences appartenant au gène du Facteur VIII, à partir desquelles on a pu analyser la totalité du gène.

Les résultats obtenus font rêver. La protéine antihémophilique possède 2 332 acides aminés, dont la séquence est entièrement déduite de celle des acides nucléiques. On lui trouve des homologies avec un autre facteur de la coagulation, le Facteur V, mais aussi, de façon imprévue, avec la ceruloplasmine, protéine impliquée dans le transport du cuivre dans le plasma. Quant au gène, le plus grand encore analysé avec celui de la thyroglobuline, il occupe 0,1 % du chromosome X et s'étend sur 186 kilobases, une taille près de 100 fois supérieure à celle d'un gène de globine. Il contient 26 exons, et, sur près de 95 % de sa longueur, est constitué par des introns.

Les compagnies qui travaillent sur le Facteur VIII ont une ambition ultime, la fabrication d'un produit commercialisable. Il ne suffit pas d'analyser le gène, il faut aussi en