

Médecine expérimentale

M. Pierre CORVOL, membre de l'Institut
(Académie des Sciences), professeur

MODELAGE ET REMODELAGE VASCULAIRE

Le cours de la Chaire de Médecine Expérimentale a poursuivi cette année l'enseignement des deux précédentes années sur le « Modelage et Remodelage Vasculaire ». Le Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) est un facteur clé de la vasculogenèse et de l'angiogenèse durant la vie embryonnaire. L'inactivation d'un des deux allèles du gène du VEGF entraîne une létalité de l'embryon de souris à 11,5 jours. Le rôle du VEGF dans l'angiogenèse post-natale a été étudié en inactivant sélectivement par le système Cre-lox les isoformes 164 et 188 du VEGF. Seule l'isoforme 120 du VEGF est alors exprimée. 50 % environ des souris VEGF^{120/120} meurent dans les quelques heures suivant la naissance, les autres dans les deux semaines suivantes. Ces souris ont une insuffisance cardiaque avec un cœur augmenté de volume, une ischémie sous-endocardique et une angiogenèse myocardique anormale. Le nombre de capillaires n'est pas modifié, mais on note une réduction du nombre des vaisseaux coronaires qui apparaissent par ailleurs immatures. Ces anomalies de l'angiogenèse s'observent essentiellement dans le cœur : les autres organes, à l'exception du rein et de la rétine, ne présentent pas d'anomalie grossière de l'angiogenèse. Ce travail de P. Carmeliet et coll. montre qu'il est possible d'inactiver sélectivement deux isoformes du VEGF et de démontrer leur rôle sélectif lors du développement du cœur chez la souris. Une autre étude sur le rôle du VEGF dans la croissance et la survie néonatale de la souris a été réalisée par H.P. Gerber et coll. qui ont montré que l'inactivation inductible du VEGF par le système Cre-lox ou l'administration intraveineuse du récepteur soluble du VEGF (sFlt-1), qui bloque l'action du VEGF au niveau de ses différents récepteurs, entraîne un arrêt de la croissance et une létalité. L'inactivation du VEGF en post-natal provoque une altération de la fonction hépatique et une insuffisance rénale. On note une apoptose accrue des cellules endothéliales hépatiques chez les animaux dont le VEGF a été inactivé, ce qui révèle que le VEGF est requis non seulement pour la

prolifération mais aussi pour la survie des cellules endothéliales. L'inactivation plus tardive (après 4 semaines) du VEGF par le récepteur soluble sFlt-1 ne provoque plus d'apoptose des cellules endothéliales, démontrant que le VEGF agit pendant un temps court durant la période néonatale. Enfin, le rôle du VEGF dans l'angiogenèse du corps jaune ovarien a été étudié par N. Ferrara et coll. chez la souris traitée par le récepteur soluble du VEGF (sFlt-1). Ce traitement abolit complètement l'angiogenèse du corps jaune lors de l'ovulation provoquant une inhibition du développement du corps jaune et de la sécrétion de progestérone, ainsi qu'une nécrose ischémique partielle du corps jaune. En revanche, les vaisseaux d'autres territoires tissulaires ne sont pas affectés. Le VEGF apparaît donc essentiel dans l'angiogenèse du corps jaune ovarien, ce qui ouvre des voies nouvelles dans le contrôle de la fertilité et le traitement des désordres ovariens liés à une hypervascularisation et à une hyperplasie. L'ensemble de ces résultats montre qu'outre son effet dans l'angiogenèse embryonnaire, le VEGF exerce une activité lors de l'angiogenèse post-natale et de l'angiogenèse ovarienne.

Les propriétés d'une isoforme du VEGF, le VEGF-C, ont été étudiées par l'équipe de K. Alitalo. Cette équipe avait trouvé que la transgénèse ciblée du VEGF-C dans la peau provoquait une hyperplasie sélective des canaux lymphatiques. Dans ce modèle de transgénèse additionnelle, il n'avait pas été noté d'effet sur les capillaires sanguins. Toutefois, un effet angiogénique similaire à celui du VEGF a été constaté dans la cornée de souris, la membrane chorioallantoïdienne de poulet et les cellules endothéliales d'aorte de porc. Il semble bien que le VEGF-C exerce un effet angiogénique *in vitro* sur les cellules endothéliales des microvaisseaux de façon similaire au VEGF *via* la production du monoxyde d'azote (NO). Enfin, le VEGF-C est capable de provoquer une néoangiogenèse dans le modèle de la patte ischémique de lapin. Ici encore, ces effets sont similaires à ceux du VEGF. Il était donc intéressant à savoir quel serait le phénotype observé lors de l'inactivation du récepteur VEGF-R3, récepteur qui reconnaît essentiellement le VEGF-C. Dans un premier temps, on observe chez les souris hétérozygotes VEGF-R3 +/-, chez lesquelles le gène β -GAL remplace le VEGF-R3, une expression du récepteur dans les vaisseaux péricardiques et les vaisseaux lymphatiques. Les souris VEGF-R3 -/- meurent à 12,5 jours de vie embryonnaire du fait d'une angiogenèse anormale des gros vaisseaux marquée par des lumières défectueuses, une anomalie de la maturation et du remodelage vasculaire. Tous ces effets s'observent avant même que les vaisseaux lymphatiques ne soient formés. Le VEGF-C semble donc jouer un rôle essentiel d'une part dans l'angiogenèse et d'autre part dans l'ontogenèse des canaux lymphatiques, où leur action pourrait être exclusive. Une autre isoforme du VEGF, le VEGF-E, a été récemment découverte. Ce VEGF est présent dans les parapoxvirus et possède les propriétés *in vitro* et *in vivo* essentielles attendues d'un VEGF : homodimérisation, libération du facteur tissulaire, prolifération et chimiotactisme des cellules endothéliales *in vitro*, angiogenèse *in vivo*. Ce VEGF ne se lie pas au récepteur R1 du VEGF (Flt-1) mais uniquement au récepteur R2 (KDR). Il

se lie par ailleurs à la neuropiline-1, co-récepteur du VEGF. Il ressort de ces études que la seule stimulation du VEGF-R2 est capable d'induire l'angiogenèse, le VEGF-R1 n'étant pas nécessaire. Par ailleurs, le VEGF-E pourrait jouer un rôle dans les tumeurs vasculaires observées lors des infections par le parapoxvirus chez l'homme et chez le mouton.

Le VEGF se lie à différents récepteurs tyrosine kinase, les récepteurs VEGF-R1, -R2 et le Placental Growth Factor (PLGF). Comme il a été indiqué, le VEGF-C se lie sur les récepteurs R2 et R3. Un co-récepteur inattendu du VEGF a été découvert, la neuropiline-1. La neuropiline est une protéine composée de trois domaines uniques impliqués dans les interactions moléculaires et/ou cellulaires. Elle lie la sémaphorine-3, protéine impliquée dans le guidage des axones neuronaux lors du développement et dont le mode d'action serait du type chemo-répulsion. La co-expression de la neuropiline-1 et du récepteur VEGF-R2 augmente l'activité chimiotactique du VEGF¹⁶⁵. L'inactivation de la neuropiline-1 inhibe la liaison du VEGF¹⁶⁵ au récepteur R2 et bloque l'activité mitogénique normalement induite par cette isoforme du VEGF. Le rôle de la neuropiline-1 dans l'angiogenèse a par ailleurs été documenté par des expériences de transgénèse de la neuropiline-1 qui ont montré une létalité à 17,5 jours de vie embryonnaire avec développement d'une hypercapillarité et la production de vaisseaux anormaux et d'une angiogenèse aberrante. L'inactivation génique de la neuropiline-1 entraîne des anomalies du développement à la fois des systèmes nerveux et cardiovasculaire. La neuropiline-1, en conjonction avec le VEGF, exercerait donc un rôle essentiel dans l'ontogenèse du système vasculaire, rôle qui pourrait être comparable à celui qu'elle exerce lors de la croissance et du guidage neuronal.

Un autre aspect intéressant des récepteurs du VEGF est le rôle d'une forme soluble du récepteur R1 du VEGF (sFlt-1). Ce récepteur avait été découvert par l'équipe de Kendall en 1993. Il est dépourvu du domaine d'ancrage membranaire et comprend les six domaines extracellulaires de type IgG du récepteur R1. Il est capable de lier le VEGF avec une affinité équivalente à celle du récepteur R1 et inhibe *in vivo* et *in vitro* l'activité du VEGF. Il se comporte en fait comme un inhibiteur du VEGF au niveau extracellulaire. Ceci a été notamment montré par des expériences de surexpression tissulaire de sFlt-1 qui provoque une anti-angiogenèse. Le récepteur sFlt-1 du VEGF est présent dans le plasma humain où il est produit par le trophoblaste villositaire et extra-villositaire. Il pourrait être relargué dans la circulation maternelle. Il est possible que sFlt-1 joue un rôle dans le contrôle de la balance angiogenèse / antiangiogenèse dans la decidua et que son rôle aille en croissant lors de la gestation comme semble le montrer son expression accrue au fur et à mesure du déroulement de celle-ci. La question du rôle principal du récepteur Flt-1 a été clairement posée par une expérience d'inactivation génique ciblée où le domaine tyrosine kinase intracellulaire de Flt-1 a été supprimé tandis qu'était conservé le domaine extracellulaire de liaison du VEGF. Un tel récepteur est capable de produire la forme soluble sFlt-1. Les

souris homozygotes pour cette inactivation génique se développent normalement (alors que les souris Flt-1 $-/-$ décèdent durant la vie embryonnaire) ; les vaisseaux sont apparemment normaux et la perméabilité vasculaire est normale. Il sera intéressant de savoir quel serait le phénotype des animaux dont la partie extracellulaire du récepteur Flt-1 aura été supprimée mais d'ores et déjà l'ensemble de ces résultats suggèrent un rôle prédominant du domaine extracellulaire (et non du domaine tyrosine kinase) du récepteur Flt-1 dans l'angiogenèse.

Le cours s'est attaché ensuite à élucider les relations entre le VEGF et le monoxyde d'azote (NO). La littérature doit être analysée avec précaution dans la mesure où NO a été rapporté comme un facteur pro-angiogénique mais aussi comme anti-angiogénique, suivant les conditions expérimentales. Toutefois, un certain nombre de résultats *in vitro* et *in vivo* plaident en faveur d'une action pro-angiogénique de NO. Le phénotype angiogénique *in vitro* du VEGF dans les cellules endothéliales pourrait dépendre de la production de NO : le VEGF induit la production de NO dans les cellules endothéliales ; le phénotype angiogénique est aboli lorsque ces cellules sont incubées avec un inhibiteur de la NO synthase. Le VEGF pourrait agir à la fois sur le taux d'ARN messager et le taux de la protéine NO synthase endothéliale (eNOS). L'augmentation de la perméabilité vasculaire due au VEGF pourrait être aussi médié par NO. Le rôle de NO dans la réponse angiogénique à l'ischémie a été étudié *in vivo* par l'équipe de J. Isner et coll. chez la souris dont le gène eNOS a été inactivé. On observe une ischémie plus marquée de la patte postérieure chez la souris eNOS $-/-$ que chez la souris contrôle. Le VEGF n'exerce plus d'effet angiogénique chez la souris angiogénique eNOS $-/-$, suggérant que l'activation de eNOS se situe en aval du VEGF.

Les métalloprotéases jouent un rôle essentiel dans le modelage et le remodelage vasculaire. Leur action est indispensable pour permettre l'effraction de la membrane basale et la progression des cellules endothéliales lors du bourgeonnement capillaire. Il existe une balance délicate entre, d'une part, l'activation des métalloprotéases — qui peut être une auto-activation ou une activation induite par une autre métalloprotéase — et, d'autre part, leur inhibition, notamment par les Tissue Inhibitor Metalloproteases (TIMPS). Les métalloprotéases sont des protéases à zinc dont les substrats sont des composants de la matrice extracellulaire. Elles sont secrétées ou ancrées dans la membrane plasmique et ont un rôle important en physiologie (implantation, développement embryonnaire, angiogenèse, ...) et en pathologie (polyarthrite, glomérulonéphrite, athérosclérose, cancer). De nombreux travaux ont porté sur l'expression, la régulation et le rôle des métalloprotéases matricielles dans le modelage vasculaire et la morphogénèse mais on ne dispose que depuis peu de données sur leur rôle respectif. L'inactivation du gène de plusieurs métalloprotéases matricielles par recombinaison homologue apporte un jour nouveau sur leur rôle lors du développement et la vascularisation de certains territoires.

La métalloprotéase de type 1 liée à la membrane (MT1-MMP) a comme substrat les collagènes I, II, III, la fibronectine, la vitronectine, la laminine et les

protéoglycans. Elle est capable d'activer les proMMP-2 et 13. Du fait de son ancrage membranaire, elle exerce un effet protéolytique péri-cellulaire. Elle a en outre une action fibrinolytique. Elle avait été localisée au niveau du squelette et dans la région péri-squelettique. L'inactivation du gène de la MT1-MMP entraîne, à l'état homozygote, un nanisme avec mort à 50-90 jours, une dysmorphie cranio-faciale, une arthrite, une ostéopénie et une fibrose tissulaire. La vascularisation du cartilage hyalin est déficiente, ce qui semble être à la source des anomalies du cartilage de croissance et de l'ossification. Le phénotype observé est plus sévère que celui résultant de l'inactivation du gène de la Matrix Metalloprotease 2 (MMP-2) ou gélatinase A, peut-être du fait des propriétés protéolytique et fibrinolytique propres à la MT1-MMP.

La MMP-2 a comme substrat la gélatine, les collagènes I, IV, V, VII, la fibronectine, l'élastine, la lamiline et la vitronectine. Elle est essentielle dans la dégradation de la membrane basale qui est constituée du collagène IV. Toutefois, l'inactivation génique de cette métalloprotéase n'entraîne aucune phénotype apparent sinon une croissance ralentie. On observe une réduction de la progression des cancers chez les souris MMP-2 $-/-$, suggérant qu'elle joue un rôle important dans l'angiogénèse tumorale et la progression des cancers. La MMP-9 (gélatinase B) a comme substrat la gélatine, les collagènes IV et V, l'élastine, la fibronectine et la vitronectine. Elle est exprimée au niveau des trophoblastes, des ostéoblastes et des cellules inflammatoires. L'inactivation de la MMP-2 provoque un retard de l'ossification endochondrale, des anomalies de la vascularisation du cartilage de croissance ainsi qu'une apoptose anormale des chondrocytes hypertrophiques. Ces anomalies de la vascularisation du cartilage de croissance pourraient être liées à une absence de relarguage de facteurs angiogéniques.

Le rôle de la vascularisation durant l'ossification endochondrale a été montré par Gerber et coll. par l'administration de sFlt-1 chez des souris de 24 jours pour bloquer l'action du VEGF à un stade critique de la croissance osseuse. L'inactivation du VEGF provoque une suppression de l'invasion vasculaire du cartilage de croissance, des anomalies de la formation des travées osseuses, une expansion de la zone des chondrocytes hypertrophiques. On observe aussi une diminution du recrutement et(ou) de la différenciation des cellules exprimant MMP-9, de la résorption des chondrocytes terminaux. Cet effet est réversible : l'arrêt de la perfusion de sFlt-1 permet une reprise de la croissance osseuse, une résorption du cartilage hypertrophique et une normalisation de l'architecture du cartilage de croissance. L'ensemble de ces résultats montre que le VEGF et la MMP-9 jouent un rôle essentiel dans l'invasion vasculaire, la fonction des chondrocytes et finalement la formation de l'os.

Le cours a enfin porté sur quelques notions essentielles sur la genèse des artères et des veines et le rôle des récepteurs Ephrines et de leurs ligands, les éphrines, dans ce processus. Les récepteurs Ephrines sont des récepteurs tyrosine kinase dont la signalisation intracellulaire implique des protéines de type Ras-GAP impliquées dans l'organisation du cytosquelette. Les ligands éphrines ont

comme particularité d'être des ligands transmembranaires et d'être exprimés dans des cellules adjacentes à celles exprimant les récepteurs Ephrines correspondant. La région intracellulaire des éphrines comporte une tyrosine qui peut être phosphorylée et intervenir dans la signalisation intracellulaire. Le couple récepteur Ephrine-éphrine joue un rôle dans la signalisation bidirectionnelle *in vivo*. Le couple EphB2/ephB2, par exemple, est essentiel au guidage des axones. Wang et al. ont montré l'importance du couple ephB2/EphB4 dans l'ontogénèse des artères et des veines. L'inactivation d'ephB2 provoque une absence du remodelage des veines et des artères dans trois régions, le sac vitellin, la tête et le cœur, dès le 9^e jour de vie embryonnaire. Le ligand ephB2 est exprimé dans les artères et son récepteur, situé au niveau des veines, est EphB4. Le couple ephB2/EphB4 interagirait de façon réciproque dans les cellules endothéliales à destinée artérielle et veineuse et permettrait la différenciation des artères et des veines. Cette conception s'oppose à celle qui prévalait jusqu'à présent, à savoir une distinction phénotypique entre artère et veine liée au type des circulations artérielle et veineuse (pression partielle d'oxygène, pression artérielle et facteurs hémodynamiques). L'inactivation du récepteur EphB4, qui provoque le même phénotype que l'inactivation de ephB2, vient conforter l'hypothèse émise par Wang et coll.

P. C.

RAPPORT D'ACTIVITÉ DU LABORATOIRE

I —É TUDE ET CARACTÉRISATION DE L'EXPRESSION DE LA RÉNINE ET DE L'ENZYME DE CONVERSION DE L'ENDOTHÉLINE : DEUX GÈNES IMPLIQUÉS DANS LA PHYSIOLOGIE ET LA PATHOLOGIE CARDIOVASCULAIRE

Équipe : F. PINET (départ septembre 2000), S. GERMAIN (arrivée février 2000), S. FUCHS, J. PHILIPPE, G. EGIDY (départ juin 2000)

Le travail de ce groupe s'articule principalement autour de deux thèmes de recherche concernant des gènes impliqués dans la physiologie et la pathologie cardio-vasculaire : l'étude de la régulation de la transcription du gène de la rénine et l'étude du système endothéline dans les phénomènes d'angiogénèse tumorale et non tumorale.

1. Étude de la régulation de la transcription du gène de la rénine humaine

Quels sont les facteurs nucléaires permettant une expression du gène de la rénine restreinte aux cellules juxtaglomérulaires du rein et aux cellules chorio-vasculaires ?

Quels sont les mécanismes responsables au niveau transcriptionnel d'une inhibition de la sécrétion de rénine en réponse à une augmentation du calcium intracellulaire ?

Ces questions ont été abordées *ex vivo* à l'aide de trois modèles de cellules productrices de rénine : les cellules chorioniques et les cellules Calu-6 dérivées d'un carcinome pulmonaire (d'origine humaine et extra-rénale) ainsi que les cellules As4.1 (d'origine murine et rénale) et *in vivo* par les techniques de transgénèse.

Cartographie du promoteur distal et du premier intron du gène de la rénine humaine

Le criblage d'une banque de cosmides en 1996 ayant permis de cloner 19 Kb de la région 5', le premier intron dans sa totalité (3.9 Kb) ainsi que 5 Kb de la région 3' ouvre de nouvelles perspectives pour identifier d'importantes régions régulatrices du gène de la rénine. Sur ces nouvelles régions, nous avons étudié le rôle du premier intron sur l'activité transcriptionnelle du promoteur rénine et montré la présence d'un « silencer » dans le modèle des cellules Calu-6 (Germain *et al.*, 1997). Cette activité de répression est spécifique des cellules productrices de rénine et l'intégrité du premier intron est nécessaire pour cette activité (Germain *et al.*, 1999).

La présence d'un enhancer a été localisé entre -5777 bp et -5552 bp en amont du site d'initiation de la transcription du gène de la rénine humaine. Cette région de 225 bp augmente l'activité basale des 892 bp du promoteur proximal dans les différents types de cellules productrices de rénine. Par les techniques d'empreinte à la DNase I et de gel retard, trois régions dans les 225 bp interagissant avec des protéines nucléaires chorioniques ont été identifiées. Aucune de ces régions à elle seule ne reproduit cette activité transcriptionnelle. Ces résultats suggèrent que cette région joue un rôle dans l'expression du gène de la rénine (Germain *et al.*, 1998) et nous avons utilisé les techniques de transgénèse pour étudier son rôle *in vivo*.

Caractérisation du promoteur de la rénine humaine par transgénèse

Plusieurs constructions de la région 5' du gène de la rénine, notamment celles contenant l'enhancer, situé entre -5777 bp et -5552 bp, associées au gène LacZ ont été injectées. La stratégie employée consiste à regarder l'expression du transgène au stade embryonnaire E15 (la rénine étant exprimée chez l'embryon à ce stade) avant d'établir des lignées. Nous avons établi différentes lignées contenant 12000 bp du promoteur de la rénine qui exprimait le transgène au niveau du rein au stade E16 de l'embryon. Une corrélation entre la localisation nucléaire du transgène par coloration de la β -galactosidase avec le marquage cytoplasmique de la rénine par immunohistochimie a été mise en évidence. Divers traitements

(notamment la déplétion sodée) sont en cours chez ces souris transgéniques pour déterminer si les variations d'expression du transgène et de la rénine endogène sont corrélées au niveau des cellules productrices de rénine.

Détermination des mécanismes transcriptionnels impliqués dans la régulation par le calcium intracellulaire

In vivo, une inhibition de la sécrétion de rénine a été observée en réponse à une augmentation du calcium intracellulaire, constituant le paradoxe calcique. Un élément nCaRE a été identifié à -1780 bp dans le promoteur de la rénine, ainsi que plusieurs autres dans des régions 5' plus distales. La fonctionnalité de l'élément nCaRE à -1,7 Kb en faisant varier les différentes conditions de calcium intracellulaire a été montrée dans le modèle des cellules chorioniques. Les interactions moléculaires ADN-protéines ont été analysées par les techniques de gel retard et de footprint, suggérant l'implication de la protéine Ref-1. L'utilisation de la protéine Ref-1 avec une étiquette permettra de clairement identifier les bases nucléiques impliquées dans cette régulation par le calcium intracellulaire.

Projets en cours :

a) Clonage des facteurs de transcription spécifiques des tissus exprimant la rénine. Ceci sera effectué par plusieurs approches dont la technique de simple hybride en préparant une banque d'ADNc de cellules juxtaglomérulaires et/ou de cellules chorioniques.

b) Facteurs impliqués dans le recrutement des cellules juxtaglomérulaires lors d'une hypertension rénovasculaire. Quels sont les mécanismes moléculaires qui permettent une expression prépondérante et restreinte de la rénine à une population cellulaire (les cellules JG du rein) ? Quels sont les facteurs impliqués dans ce recrutement lors d'une sténose de l'artère rénale ? Pour essayer de répondre à cette question, un modèle expérimental d'hypertension artérielle rénovasculaire sera utilisé, le modèle imaginé par Goldblatt *et al.* (1934), 1 clip - 2 reins chez le rat Lewis (rat syngénique) avec développement de l'hypertension pendant 2 semaines (collaboration J.B. Michel, U460). Les artéριοles seront isolées selon la technique décrite par C. Chatziantoniou (U489). Nous étudierons les différences d'expression des gènes (apparition, disparition) entre les deux populations (rein clippé, rein normal) par la technique de « Differential Display » en suivant un protocole modifié de Liang et Pardee (1992) et par l'analyse en gel 2 dimensions.

2. Rôle du système endothéline dans les phénomènes d'angiogénèse tumorale et non tumorale

Quel est le rôle du système endothéline dans un contexte physiopathologique ?

Le développement d'outils : anticorps anti-ECE-1 et de ribosondes pour la préproET-1, l'ECE-1 et les récepteurs ETA et ETB, de techniques : liaison de

¹²⁵I ET-1 sur coupes congelées et de modèles : mesure de l'activité ECE-1 en cellules CHO, mesure de l'activation des voies de signalisation des récepteurs à l'endothéline en cellules CHO, nous a permis de développer plusieurs projets concernant le système endothéline.

Distribution et caractérisation du système endothéline

Un profil d'expression du mRNA de l'ECE-1 et de la protéine identique a été observé dans la plupart des tissus humains non pathologiques. Son expression est particulièrement élevée dans les systèmes cardiovasculaire, reproducteur et endocrine. De plus une très forte expression a été trouvée au niveau de la surrénale avec une expression majeure au niveau de la zone glomérulée. Ceci suggère que l'ECE peut être impliquée dans d'autres systèmes (régulation de la sécrétion d'hormones) que seulement la maturation de la bigET-1 (Korth *et al.*, 1999).

La distribution cellulaire du système endothéline (préproET-1, ECE-1, ETA et ETB) dans le colon humain a été effectué par hybridation *in situ* (HIS) et immunohistochimie. La présence de tout le système endothéline suggère son implication dans la fonction de la muqueuse de colon normal et la sécrétion d'ET-1 comme peptide neuro- et vasoactif (Egidy *et al.*, 2000).

Rôle du système endothéline dans diverses tumeurs d'origine humaine

L'expression (hybridation *in situ*, immunocytochimie) et la régulation différentielle (RT/PCR) du système endothéline a été étudiée dans les adénocarcinomes de colon, par comparaison du tissu sain et du tissu tumoral en collaboration avec L. Juillerat-Jeanneret (Lausanne, Suisse). Il apparaît que le système endothéline est hyperactivé dans les tumeurs et fonctionne de façon paracrine envers les vaisseaux et les myofibroblastes du stroma avec notamment une très forte expression de ETB. Nos résultats suggèrent une redistribution de fibroblastes exprimant l' α SMA qui précéderait l'induction du récepteur ETB impliqué dans la régulation du développement vasculaire (Egidy *et al.*, soumis).

L'utilisation de lignées de cellules originaires d'un carcinome de colon nous a permis de montrer que l'endothéline pourrait être un facteur de survie pouvant protéger les cellules contre l'apoptose induit par FasL (PedutoEberl *et al.*, 2000).

Rôle des récepteurs ETB dans la maladie de Hirschsprung

Le groupe de S. Lyonnet et A. Munnich (U393) a découvert des mutations du récepteur ET-B (Amiel *et al.*, 1996) chez des patients atteints de la maladie de Hirschsprung. Nous avons étudié le rôle fonctionnel de ces mutations (G57S, R319W et P383L) après expression stable en cellules recombinantes. P383L n'est pas exprimé à la membrane et ne permet donc pas de liaison à l'endothéline.

G57S et R319W sont exprimés comme le récepteur sauvage, ont une activation de la signalisation via Gq identique à ETB sauvage par contre ces deux mutants ont perdu le couplage à Gi impliquée dans l'inhibition d'accumulation d'AMP cyclique (Fuchs *et al.*, soumis).

Projets en cours :

a) *Rôle du système endothéline dans la surrenale.* L'expression des trois gènes de l'ECE est en cours d'étude dans les adénomes de Conn par les techniques de RT-PCR et d'expression des autres éléments du système endothéline par Northern Blot, et hybridation *in situ* en utilisant les échantillons du réseau COMETE. Une analyse de la régulation du système endothéline en culture de cellules est en cours.

b) *Rôle du système endothéline dans les glioblastomes.* Une analyse est en cours par hybridation *in situ* des tissus congelés et immunohistochimie à l'aide d'anticorps permettant d'identifier les divers types cellulaires. Le rôle de l'endothéline comme facteur de survie est en cours d'étude en utilisant différentes lignées de cellules obtenues à partir de glioblastomes.

II — PEPTIDES-HORMONES DANS LE DÉVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE ET L'ANGIOGÉNÈSE

Équipe : J.-M. GASC, H. KEMPF (départ février 2000), J. FAVIER, A. CRUZ, J. KEARSEY (arrivée octobre 1999), M.-T. MORIN, F. MONGIAT

Après avoir réalisé l'inactivation pharmacologique de la voie « endothéline 1-récepteur ETA », et avoir ainsi montré le rôle spécifique de l'endothéline 1 comme facteur de croissance des structures cranio-faciales et cardio-vasculaires dérivant des crêtes neurales, nous nous sommes intéressés aux propriétés angiogéniques de l'endothéline 1. Ce peptide, connu comme un vasoconstricteur très puissant, semble être doué, comme l'isopeptide endothéline 3, de propriétés multiples. La possibilité d'effets angiogéniques était suggérée par les études en culture de cellules *in vitro* mais n'avait pas été montrée *in vivo*. Nous avons donc entrepris une étude des propriétés angiogéniques de l'endothéline 1 sur la membrane chorio-allantoïdienne de l'embryon de poulet.

L'angiogénèse, qu'elle soit embryonnaire, physiologique ou pathologique, est devenue ces dernières années un objectif principal de nos recherches. L'hypoxie est une des conditions physiopathologiques fréquemment proposée lorsqu'il y a un remodelage anormal de la vascularisation. C'est pourquoi, nous avons entrepris d'étudier le rôle de l'hypoxie sur deux modèles d'angiogénèse défectueuse : les phéochromocytomes et l'ischémie critique des membres inférieurs. Nous avons par ailleurs continué l'étude du rôle du facteur de transcription EPAS-1 (aussi appelé HIF2 α) dans certains mécanismes d'angiogénèse, notamment ceux liés à l'hypoxie.

1. Propriétés angiogéniques de l'endothéline 1

L'endothéline 1 (ET-1) est un puissant agent vasoconstricteur qui stimule *in vitro* la migration et la prolifération des cellules endothéliales. La membrane chorio-allantoïdienne (CAM) de l'embryon de poulet a été utilisée pour mettre en évidence *in vivo* les propriétés angiogéniques de l'ET-1. Des cellules CHO produisant de l'ET-1 (CHO-ET1) après cotransfection des cDNA du précurseur (pre-pro-ET-1) et de l'ECE-1, l'enzyme de conversion nécessaire à la maturation du peptide actif, ont été greffées sur la CAM d'embryons de 9 jours. L'observation, 6 jours après la greffe, montre que les cellules CHO-ET1 s'insèrent à l'intérieur de la CAM où elles forment des nodules arrondis. Au contraire, les cellules contrôles (CHO et CHO-ECE1) restent le plus souvent à la surface de la CAM où elles dégènèrent et, dans les rares cas où elles pénètrent sous l'ectoderme, le nodule formé est petit et plat. De plus, l'examen macroscopique et histologique montre que les cellules CHO-ET1 induisent dans la CAM la formation d'une structure vasculaire rayonnante autour du nodule qui est lui-même envahi par un réseau dense de vaisseaux neo-formés provenant de la CAM. L'effet prolifératif de l'ET1 produite par les nodules a été montré par l'augmentation de l'incorporation de BrdU dans les cellules endothéliales des vaisseaux de la CAM autour des cellules CHO-ET1 greffées. Afin de confirmer l'implication du « système endothéline » dans ces effets, nous avons montré par hybridation *in situ* que l'ET-1 était bien exprimée dans les nodules et que les messagers des récepteurs ETA et ETB étaient présents dans la paroi des vaisseaux, à l'intérieur et hors des nodules. De plus, la spécificité de cet effet angiogénique des cellules CHO-ET1 a été confirmée par l'utilisation d'inhibiteurs du système : le bosentan (un ligand antagoniste des récepteurs des endothélines) et le phosphoramidon (un inhibiteur de l'ECE-1) qui tous deux, bloquent les effets angiogéniques induits par les greffons CHO-ET1. Afin de déterminer si l'effet angiogénique observé pouvait emprunter la voie du VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), nous avons vérifié par hybridation *in situ*, la présence des récepteurs (VEGFR2 et VEGFR3) dans la vascularisation des nodules puis réalisé le blocage de la voie de signalisation du VEGF avec un antagoniste spécifique.

L'ensemble de ces résultats suggère fortement un effet angiogénique de l'ET-1 sur les vaisseaux de la CAM qui, après avoir vascularisé la tumeur, assurent sa croissance.

2. EPAS-1 : un acteur dans la réponse angiogénique

EPAS1 (HIF2 α) est un facteur de transcription de type bHLH-PAS, cloné chez l'homme et la souris en 1997 et fortement exprimé dans le réseau vasculaire lors du développement. Les résultats *in vitro* suggèrent un rôle de ce facteur dans la régulation de l'angiogenèse. En effet, EPAS1 est induit en conditions hypoxiques et active les promoteurs du VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), de son

récepteur Fik1 (VEGFR-2) et du récepteur endothélial Tie-2, tous des acteurs majeurs de l'angiogenèse. Cependant, l'inactivation génique d'EPAS1 chez la souris a mis en évidence un nouveau rôle de ce facteur de transcription. En effet, les souris homozygotes EPAS1^{-/-} sont létales bien que ne présentant pas d'anomalies vasculaires visibles. La létalité est due à une insuffisance des catécholamines, entraînant une bradycardie prononcée. Ces observations ont permis de proposer deux nouveaux gènes cibles potentiels pour EPAS1 : la dopamine beta-hydroxylase (DBH) et la Tyrosine hydroxylase (TH), deux enzymes de la biosynthèse des catécholamines, elles-mêmes surexprimées en réponse à l'hypoxie.

À l'heure actuelle, le rôle d'EPAS1 dans la régulation de l'angiogenèse reste donc à démontrer *in vivo*. Dans ce but, nous avons développé deux approches en parallèle : d'une part, une étude d'expression d'EPAS1 et de ses gènes cibles dans différentes conditions angiogéniques chez l'homme et, d'autre part, une étude expérimentale sur le modèle de l'embryon de poulet.

Nous avons réalisé une comparaison détaillée des profils d'expression d'EPAS1, de ses gènes cibles potentiels et de son homologue HIF1 α au cours du développement précoce de l'embryon humain. Cette étude a permis de montrer que ce facteur de transcription était coexprimé avec ses gènes cibles dans nombreux sites au cours de l'embryogenèse et que les activations transcriptionnelles observées *in vitro* pouvaient donc avoir lieu *in vivo*. Par ailleurs, l'étendue du spectre d'expression de HIF1 α que nous avons observée suggère que, dans les expériences d'inactivation génique, l'absence d'EPAS1 pourrait être complétée par ce dernier, masquant alors le rôle d'EPAS1 dans l'angiogenèse embryonnaire.

Pour l'étude de l'angiogenèse tumorale, nous avons choisi les phéochromocytomes. Ces tumeurs sont un bon modèle pour l'étude d'EPAS1 car elles rassemblent deux propriétés où le facteur EPAS1 serait impliqué : elles expriment fortement les catécholamines et elles sont le siège d'une néovascularisation anarchique. Ce projet est réalisé en collaboration avec le Réseau Comète (Hôpital Broussais), qui nous permet de disposer de prélèvements bénins et malins pour lesquels le tableau clinique des patients est connu. Nous avons déjà analysé les profils d'expression de différents gènes d'intérêts (EPAS1, HIF1 α , VEGF, VEGFR-1 et -2, Tie2, TH, Thrombospondine, gènes du système endothéline) sur 14 tumeurs bénignes et 8 tumeurs malignes. Les premiers résultats suggèrent qu'il existe probablement des patrons d'expression caractéristiques de la sévérité de la tumeur.

Par ailleurs, afin de comprendre la fonction exacte d'EPAS1 *in vivo*, nous avons entrepris son étude fonctionnelle sur le modèle expérimental de l'embryon de poulet. Nous avons donc cloné l'homologue aviaire d'EPAS1 et déterminé son patron d'expression détaillé au cours du développement de l'embryon de poulet. Nous avons mis au point une technique de transfection *in vivo*, dans les

cellules endothéliales vasculaires et construit un dominant négatif de ce facteur, dépourvu de domaine d'activation de la transcription, mais capable de s'hétérodimériser et de se lier à l'ADN. L'expression de cette protéine tronquée devrait permettre prochainement de déterminer de façon précise la fonction d'EPAS1 au cours de l'angiogenèse embryonnaire.

3. Ischémie des membres inférieurs

L'artériopathie oblitérante des membres inférieurs est une complication fréquente et sévère de l'athérome. Elle provoque une ischémie et une hypoxie tissulaire en aval de l'oblitération des vaisseaux. A un stade avancé, elle se complique d'ischémie critique, situation gravissime marquée par des troubles trophiques distaux, une nécrose tissulaire conduisant encore souvent à des amputations de membre inférieur. L'absence de traitement médical efficace jusqu'à présent a justifié la mise en place des tous premiers essais de thérapie angiogénique chez l'homme et justifie la recherche de nouvelles cibles thérapeutiques.

Nous avons abordé ce projet par deux voies différentes : une voie habituelle qui consiste à comparer l'expression des acteurs de l'angiogenèse et de la réponse à l'hypoxie, entre le tissu sain et le tissu où la revascularisation n'a pas lieu malgré un défaut d'oxygénation. Par ailleurs, nous avons abordé cette question du rôle de l'hypoxie dans les mécanismes de revascularisation par une approche nouvelle. En association avec une entreprise de biotechnologie (Société ExonHit Therapeutics) et grâce à une technologie originale, mise au point et brevetée par ce partenaire, nous voulons identifier les variants d'épissage caractéristiques de l'état sain ou de l'état ischémique. Cette approche technologique a permis d'identifier des gènes qui sont l'objet d'un épissage alternatif spécifique de la condition hypoxique. On retrouve ces exons transcrits dans des cellules en culture privée d'oxygène aussi bien que dans la partie ischémique du membre amputé pour ischémie critique. L'étude fonctionnelle de ces gènes, probablement impliqués dans l'angiogenèse, est en cours.

III —É TUDE DE DEUX MÉTALLOPROTÉASES IMPLIQUÉES DANS LE REMODELAGE VASCULAIRE, L'ENZYME DE CONVERSION DE L'ANGIOTENSINE ET LA MÉTALLOPROTÉASE CRYPTIQUE DE LA FIBRONECTINE

Équipe : P. CORVOL, C. HUBERT, M. PAGANO, A. MICHAUD, X. HOUARD

1. Enzyme de conversion de l'angiotensine

L'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) découvert initialement chez les mammifères a un équivalent chez l'insecte. En étudiant l'ECA de drosophile, en collaboration avec l'équipe du Pr. Elwyn Isaac (Univ. of Leeds, UK), nous

avons découvert l'existence de deux isoenzymes dans cette espèce. Ces deux ECA, dénommées AnCE et ACER n'ont qu'un site catalytique (au lieu de deux chez les mammifères) et sont dépourvues de pièce d'ancrage membranaire. Nous avons précédemment montré que ces ECA pourraient être impliquées dans la maturation des précurseurs immédiats des neuropeptides et des hormones en clivant le doublet basique C-terminal Lys-Arg de ces peptides. Nous suggérons qu'il pourrait s'agir là d'un rôle ancestral de l'ECA, permettant la maturation terminal d'un peptide actif.

L'hypothèse d'un rôle de type « prohormone convertase » de l'ECA a été étudiée chez des souris dont le gène de la carboxypeptidase E (CPE) a été inactivé. La CPE clive séquentiellement les acides aminés basiques terminaux des précurseurs immédiats des neuropeptides et des hormones. Les souris dont le gène de la CPE a été inactivé sont capables de cliver les résidus basiques C-terminaux de ces précurseurs, ce qui indique l'existence d'enzymes plasmatiques ou tissulaires pouvant générer les hormones actives. L'ECA hydrolyse les acides aminés basiques C-terminaux du précurseur de la cholécystokinine (CCK5-GRR) et du LH-RH (LH-RH-GKR). En revanche, l'ECA ne clive pas la diarginyl-insuline en insuline, tandis que la CPE le peut. Les deux sites catalytiques ont la même affinité (K_m) pour le CCK5-GRR mais le domaine N-terminal a une plus grande efficacité catalytique. L'ECA peut donc être considérée comme une alternative à la CPE dans l'hydrolyse des acides aminés basiques Lys/Arg de certains peptides.

L'activité séparée des deux sites catalytiques de l'ECA, appelés domaines N et C, a été étudiée pour la première fois chez l'homme *in vivo* en utilisant trois substrats : l'angiotensine I qui est clivée de façon similaire par les deux domaines, le peptide Hip-His-Leu qui est spécifique du domaine C et le peptide AcSDAcKP, un nouveau substrat spécifique du domaine N. Nous avons aussi étudié l'inhibition *in vitro* et *in vivo* des deux domaines de l'ECA par un inhibiteur mixte de l'ECA et de l'endopeptidase neutre, l'omapatrilate. *In vitro* l'omapatrilate inhibe également l'activité catalytique des domaines N et C de l'ECA. *In vivo*, l'omapatrilate inhibe aussi de façon similaire les deux domaines de l'ECA, ainsi qu'on peut le juger sur les taux d'hydrolyse des substrats spécifiques des domaines, ainsi que sur les concentrations plasmatiques d'angiotensine I et II, d'AcSDAcKP et d'AcSDKP dans les urines. Cette étude montre qu'il est possible d'évaluer séparément la sélectivité *in vitro* et *in vivo* d'inhibiteurs purs de l'ECA et d'inhibiteurs mixtes d'ECA/NEP.

La contribution de chacun des deux domaines N et C à l'activité de l'ECA ne peut être approchée actuellement que par l'utilisation d'un inhibiteur sélectif du domaine-N, le pseudopeptide RXP407, que nous avons rapportée en 1999. Ce peptide phosphinique inhibe 1 000 fois plus *in vitro* le domaine-N que le domaine-C de l'ECA. Une autre approche est en cours : l'inactivation sélective des domaines-N et -C de l'ECA par la technique de « knock-in » chez des souris génétiquement modifiées. La technique consiste à muter les deux histidines d'un

site catalytique en les substituant par des lysines. Ainsi peut-être produit un ECA ne contenant plus qu'un seul site actif. Par recombinaison homologue en utilisant le système Cre-Lox, il est possible de remplacer le gène de l'ECA de la souris par une telle enzyme mutée. Notre laboratoire a récemment entrepris le « knock-in » de l'ECA dont le domaine C-terminal a été inactivé tandis que parallèlement celui du Dr. K. Bernstein (Emory University, Atlanta, USA) procédait à une construction similaire pour le domaine-N de l'ECA. La production de souris génétiquement modifiées devrait ainsi apporter des renseignements précieux sur la contribution respective *in vivo* de chacun des deux domaines de l'ECA.

2. Métalloprotéase cryptique de la fibronectine

L'étude de la métalloprotéase cryptique de la fibronectine localisée dans le domaine liant la gélatine de cette protéine (GBD) a été développée au moyen des deux modèles expérimentaux suivants :

a) Isolement de la protéase active à partir de sérum de veau nouveau né, preuve de l'existence in vivo de cette enzyme

Nous avons caractérisé cette protéase dans les sérums de veau fœtal et nouveau né ainsi que dans le sérum de bœuf. L'emploi d'inhibiteurs spécifiques, le batimastat (BB94) qui inhibe seulement les métalloprotéases matricielles (MMPs), et un peptide phosphinique qui inhibe seulement la protéase de la fibronectine, ainsi que l'utilisation d'un substrat fluorescent très sensible commun aux 2 types de protéases rendent ce travail possible. Il est apparu que le sérum de veau nouveau né représente la source la plus favorable pour l'isolement. Cette opération a été réalisée par filtration sur gel du produit de départ et par 2 étapes de chromatographies d'affinité sur héparine-agarose et gélatine-agarose. Ces propriétés d'affinité correspondent aux domaines structuraux présents dans ce fragment de fibronectine. L'enzyme purifiée migre comme une bande unique de masse moléculaire de 63 kDa après électrophorèse en gel SDS colorée au nitrate d'argent, et le western-blotting réalisé au moyen d'un anticorps polyclonal dirigé contre la fibronectine révèle une bande de même masse moléculaire. La zymographie montre 2 plages de lyse correspondant à des masses moléculaires de 120 et 150 kDa, ce qui pourrait traduire une dimérisation et la formation d'agrégats liées aux conditions non-dénaturantes employées pour cette dernière méthode. La protéase purifiée présente des propriétés similaires à celles observées pour la protéase générée *in vitro*. La détermination de la séquence N-terminale qui est en cours devrait permettre d'identifier la protéase impliquée dans la maturation et donc d'aborder les rôles physiopathologiques éventuels de la protéase sérique dérivée de la fibronectine. L'obtention d'anticorps spécifiques dirigés contre la métalloprotéase isolée devrait aussi permettre des études sur sa localisation *in vivo*.

b) Libération de la métalloprotéase cryptique de la fibronectine dans des cultures primaires de cellules vasculaires musculaires lisses (CMVL), étude du rôle possible de cette protéase dans le remodelage vasculaire

Les cellules vasculaires musculaires lisses synthétisent les protéines de la matrice extracellulaire ainsi que les MMPs et leurs inhibiteurs, les TIMPs 1 et 2. De cette façon, elles interviennent dans le remaniement de la paroi vasculaire. Nous avons montré que la plasmine exogène ajoutée au milieu conditionné par les CMVL fait apparaître la protéinase de la fibronectine. Un résultat semblable est obtenu par addition de plasminogène aux cellules en culture, ce qui montre que les activateurs du plasminogène sécrétés par ces cellules peuvent conduire à la plasmine, puis à la protéinase de la fibronectine. La thrombine ajoutée au milieu conditionné provoque le même effet. Ces 2 protéases agissent de façon dose-dépendante dans ce processus. Par contre, la génération de MMPs endogènes dans ces milieux conditionnés par addition de p-aminophénylmercuriacétate (APMA) ne provoque pas l'apparition de la protéase de la fibronectine. Il semble qu'il existe une spécificité de libération de la protéase dépendante des protéases à serine de la coagulation et de la fibrinolyse. Ce système protéolytique pourrait être modulé par l'angiotensine II. En effet, cette hormone augmente la synthèse de la fibronectine et du collagène I dans les CMVL. Elle agit aussi sur la synthèse des composants du système plasmine. Elle pourrait donc ainsi intervenir dans le remodelage physiopathologique de la paroi vasculaire.

IV —É TUDE DU TRAFIC INTRACELLULAIRE DE L'ENZYME DE CONVERSION DE L'ENDOTHÉLINE

Équipe : C. TOUGARD, L. MULLER, A. BARRET, E. ÉTIENNE,
C. SOUNDARAMOURTY

L'enzyme de conversion de l'endothéline (ECE), l'enzyme-clé dans la formation d'endothéline active, existe sous la forme de quatre isoformes qui résultent de l'épissage alternatif d'un seul et même gène. Ces isoformes (ECE-1a, ECE-1b, ECE-1c et ECE-1d) sont des protéines transmembranaires de type II qui ne diffèrent que par la partie N-terminale de leur court domaine cytoplasmique. Cette particularité structurale fait que l'on ne dispose pas à l'heure actuelle d'anticorps différenciant chacune de ces isoformes et leur distribution tissulaire et cellulaire spécifique n'a pu être analysée.

Nous avons donc précédemment étudié la distribution subcellulaire des isoformes de l'ECE-1 dans des lignées stables de cellules CHO transfectées avec le cDNA codant respectivement pour chacune d'entre elles et montré que, dans ces modèles cellulaires qui n'expriment pas l'enzyme d'une manière endogène, les quatre isoformes présentent chacune une distribution subcellulaire caractéristique : alors que l'ECE-1a est principalement détectée à la surface des cellules, l'ECE-1b est exclusivement intracellulaire et l'ECE-1c et l'ECE-1d présentent

une distribution intermédiaire et sont exprimées à la fois à la surface et à l'intérieur des cellules. De plus, nous avons identifié deux motifs di-leucine dans le domaine cytoplasmique de l'ECE-1b responsables de l'adressage intracellulaire de cette isoforme. Ce domaine est suffisant pour modifier l'adressage de protéines membranaires exprimées exclusivement à la surface des cellules comme l'ECE-1a ou l'endopeptidase neutre lors de la construction de protéines chimériques.

Au cours de l'année écoulée, nous avons poursuivi ces recherches au niveau de deux autres modèles cellulaires pilotes : une lignée de cellules neuroendocrines et une lignée de cellules endothéliales.

1. Étude dynamique du trafic intracellulaire et de l'adressage des isoformes de l'ECE-1 dans les cellules antéhypophysaires de souris de la lignée AtT20

Nous avons précédemment montré que certaines cellules de l'antéhypophyse du rat exprimaient l'ECE-1 et nous avons effectivement constaté que les cellules de la lignée AtT20 exprimaient de l'ECE-1 endogène. Afin de pouvoir discriminer le tri et l'adressage dans ces cellules de chaque isoforme, nous les avons transfectées avec des constructions codant pour chacune d'entre elles marquée par une étiquette antigénique flag et avons observé la même hétérogénéité de distribution subcellulaire que précédemment dans les cellules CHO. L'expression des isoformes à la surface des cellules a été quantifiée et nous menons à l'heure actuelle une étude approfondie de la cinétique d'internalisation de l'enzyme exprimée au niveau de la membrane plasmique. Il apparaît d'ores et déjà que la demi-vie des isoformes présentes à la surface des cellules AtT20 ainsi que leur cinétique d'internalisation sont différentes. En particulier, nous avons constaté que, dans les cellules qui surexpriment l'ECE-1b, la majorité de l'enzyme se trouve au niveau de l'appareil de Golgi et de structures endosomales mais au moins une partie de l'enzyme est adressée vers la membrane plasmique et est internalisée très rapidement. Nous envisageons, par une analyse réalisée au microscope confocal et par des doubles marquages immunofluorescents, d'identifier les compartiments mis en jeu dans l'internalisation de chaque isoforme et leur éventuel recyclage.

De plus, nous poursuivons l'étude par mutagenèse dirigée des éléments structuraux responsables de l'adressage et du transit différentiel des quatre isoformes. A long terme, cette analyse vise à élucider les mécanismes moléculaires de la régulation de la distribution subcellulaire différente des isoformes de l'ECE-1 et de comprendre ainsi la signification fonctionnelle de cette hétérogénéité.

2. Trafic intracellulaire et adressage des isoformes de l'ECE-1 dans les cellules endothéliales humaines de la lignée EAhy 926

Il est bien établi que les cellules endothéliales *in vivo* ainsi que la plupart des lignées de cellules endothéliales testées expriment l'ECE-1. Nous avons montré par RT-PCR que les cellules endothéliales de la lignée EAhy 926 expriment d'une manière endogène les quatre isoformes de l'ECE-1 (Muller et al. sous presse). Afin de différencier clairement les isoformes dans ce modèle cellulaire, nous avons donc sélectionné des clones stables de cellules EAhy 926 exprimant chaque isoforme étiquetée par un motif flag.

Notre projet est d'analyser la distribution subcellulaire des isoformes dans ces cellules cultivées dans des conditions expérimentales qui maintiennent la polarité qu'elles présentent *in vivo* dans leur environnement physiologique. Pour ce faire, nous rechercherons l'expression de marqueurs des jonctions intercellulaires spécifiques de la monocouche de cellules endothéliales puis, dans ce contexte, nous effectuerons une étude au microscope confocal de la distribution tri-dimensionnelle des quatre isoformes. Enfin, nous mènerons une étude dynamique de leur trafic intracellulaire, de leur stabilisation à la surface des cellules et de leur éventuelle endocytose ou transcytose en relation avec leur rôle physiologique.

V —É TUDE DE L'ORGANISATION ET DU RÔLE FONCTIONNEL DU SYSTÈME RÉNINE-ANGIOTENSINE CÉRÉBRAL : MÉTABOLISME ET RÉCEPTEURS

Équipe : C. LLORENS-CORTÈS, A. HUS-CITHAREL, N. DE MOTA, Z. LENKEI (départ juin 2000), A. RÉAUX, X. ITURRIOZ, R. ROZENFELD, I. SKULTETYOVA (départ septembre 2000)

OBJECTIF GÉNÉRAL

Le principal thème de recherche de ce groupe de travail est l'étude de l'organisation et du rôle fonctionnel du système rénine-angiotensine (SRA) cérébral dans le contrôle central de la pression artérielle et la sécrétion des hormones hypophysaires. L'accent est mis 1) sur l'identification des enzymes impliquées dans le métabolisme de l'angiotensine II et de l'angiotensine III, par l'inhibition de leur activité au moyen de molécules spécifiques originales, 2) sur la détermination des rôles physiologiques respectifs de l'angiotensine II et III dans le contrôle central des fonctions cardio-vasculaires, 3) sur la distribution, la localisation cellulaire et la caractérisation pharmacologique des récepteurs de l'AngII et de l'AngIII dans le SNC et l'hypophyse.

Parallèlement, un nouveau thème de recherche est mis en place actuellement et concerne l'identification de ligands endogènes de récepteurs orphelins à 7 domaines transmembranaires (GPCRs) présents dans le SNC et leur rôle physiologique.

1. Ectoenzymes et métabolisme de l'angII et de l'angIII cérébrales

A - Organisation du site actif de l'APA

1. Objectif

Une définition approfondie du rôle physiologique de l'APA nécessite l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques et sélectifs. La structure de ces molécules peut-être définie à partir de la modélisation de son site actif.

2. Travaux réalisés

L'aminopeptidase A (APA) ou glutamyl aminopeptidase est une glycoprotéine membranaire homodimérique de 260 kDa contenant la séquence consensus HEXXH caractéristique des métalloprotéases à zinc. Elle possède une spécificité de substrat pour les acides aminés acides en position N-terminale des peptides tels que l'angiotensine II et la cholécystokinine 8. Le calcium (Ca^{2+}) a un effet activateur très important sur l'APA. Des données suggéraient que l'His 450 dans l'APA de par sa localisation dans le site actif de cette enzyme et de par son absence dans l'APB pourrait intervenir dans la liaison du substrat de manière directe ou indirecte par l'intermédiaire du Ca^{2+} . La substitution de cette histidine par une phénylalanine provoque une chute de l'activité enzymatique de l'APA mutée purifiée et du pouvoir activateur du Ca^{2+} . En effet le mutant nécessite 10 fois plus de Ca^{2+} pour être au maximum d'activation. Cette mutation provoque une augmentation du K_m et une baisse du k_{cat} . De plus les cinétiques enzymatiques réalisées en présence de différentes concentrations de Ca^{2+} montrent que le Ca^{2+} n'a plus d'effet sur l'affinité de l'enzyme pour le substrat comme dans l'APA sauvage, mais plutôt sur la vitesse d'hydrolyse. La détermination du pouvoir inhibiteur de différents composés, interagissant avec le sous-site S1 de l'enzyme comme le GluSH, le LysSH et le GluPO_3H_2 , a permis de montrer que l'His 450 intervenait dans la catalyse enzymatique et en synergie avec le Ca^{2+} assurait la spécificité de substrat de l'APA pour les résidus N-terminaux acides (Iturrioz, Vazeux, Célérier, Corvol et Llorens-Cortès, *Biochemistry*, 2000, 39, 3061-3068).

3. Travaux en cours

Dosage enzymatique de l'APA sur un substrat naturel (hydrolyse de l'angiotensine II en angiotensine III). Poursuite de la caractérisation du site actif de l'APA. Recherche des cystéines responsables des ponts disulfures participant à la dimérisation de l'enzyme.

B - Inhibiteurs de l'APA

1. Objectif

La synthèse d'inhibiteurs spécifiques de l'APA est déterminante pour estimer son rôle fonctionnel. La conception et la synthèse de ces produits sont effectuées dans l'U266 de l'INSERM dirigée par B. Roques (Équipe de M.-C. Fournié-Zaluski). Les composés les plus intéressants sont l'EC33 et l'EC27, avec un K_i respectivement de 0,29 et 0,032 μM

2. Travaux en cours et projets

Bien que l'EC33 ait représenté le premier inhibiteur sélectif de l'APA et qu'il ait été utile pour établir les premières données sur le rôle physiologique de cette enzyme dans le contrôle central des fonctions cardiovasculaires, il était nécessaire pour poursuivre notre programme de modifier cette molécule pour obtenir des inhibiteurs de l'APA de haute affinité (affinité subnanomolaire) et sélectifs par rapport à d'autres ectoenzymes intervenant dans le métabolisme des peptides vasoactifs.

Des inhibiteurs très efficaces (K_i nanomolaire) ont été obtenus avec des composés possédant en S1 un résidu carboxylate ou sulfonate, un résidu hydrophobe aliphatique (Ile) ou aromatique (Tyr) en position S1' et un résidu chargé négativement (Asp) en S2'. Le meilleur composé a la formule suivante : $\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-)\text{CH}(\text{SH})\text{CO-Ile-(3-COOH)Pro}$ ($K_i = 0,87$ nM sur l'APA). Ces inhibiteurs sont très sélectifs vis-à-vis de l'APN et de l'ACE, deux gluzinines impliquées également dans la cascade angiotensinergique. Par contre, ils reconnaissent avec une assez bonne affinité la NEP (David *et al.*, *J. Med. Chem.*, 1999 ; 42 : 5197-5211).

L'équipe de Vincent DIVE (Lab. d'Ingénierie et d'Études des Protéines, CEA, Gif-sur-Yvette) en collaboration avec notre laboratoire, a développé des inhibiteurs de l'APA capables d'interagir avec les sous-sites S1, S1' et S2' de l'enzyme et possédant un groupement phosphinique interagissant avec l'atome de zinc de l'APA. Le plus sélectif d'entre eux $\text{Glu}\psi(\text{PO}_2\text{CH}_2)\text{Leu-Arg}$ a une affinité de 30 nM pour l'APA et reconnaît 100 fois moins bien l'APN, l'ACE et la NEP (Georgiadis, Vazeux, Llorens-Cortès, Yiotakis, Dive, *Biochemistry*, 2000 ; 39 : 1152-1155).

À partir de ces données, il est possible de prévoir : la synthèse d'une molécule radiomarquée et de prodrogues.

C - Rôles physiologiques de l'aminopeptidase A et de l'aminopeptidase N dans le système rénine-angiotensine cérébral : rôles respectifs de l'angII et de l'angIII dans le contrôle central des fonctions cardiovasculaires

Effet des inhibiteurs d'APA et d'APN sur la pression artérielle

1. Travaux réalisés

Il est bien établi que l'injection par voie i.c.v d'AngII ou d'AngIII induit une augmentation de la pression artérielle. Si l'AngIII est le peptide effecteur du SRA cérébral dans le contrôle de cette fonction comme dans le cas de la sécrétion de vasopressine, le blocage de l'APA devrait provoquer une chute de la pression artérielle.

Afin de tester cette hypothèse, l'AngII ou l'AngIII ont été injectées par voie i.c.v chez le rat anesthésié ou vigile en absence ou en présence des inhibiteurs d'APA ou d'APN, et la pression artérielle (PA) ainsi que la fréquence cardiaque ont été enregistrées après cathétérisme de l'artère fémorale. L'effet de ces inhibiteurs a été aussi étudié dans un modèle expérimental d'hypertension artérielle (HTA) (rat spontanément hypertendu) parallèlement au rat normotendu Wistar-Kyoto.

Le blocage central de l'APA par l'injection i.c.v. d'EC33 induit un effet hypotenseur dose-dépendant plus marqué chez le rat spontanément hypertendu que chez le rat normotendu (effet maximal -30mmHg à 100µg, durée 4 heures), alors que l'injection par voie i.v. de l'EC33 (45mg/kg) ne modifie pas la PA. Ces données indiquent que la conversion, dans le cerveau, de l'AngII en AngIII est nécessaire pour induire un effet presseur, suggérant que l'AngIII est l'effecteur du SRA cérébral, responsable de l'augmentation de PA.

Pour confirmer cette hypothèse, nous avons étudié les effets sur la PA d'un inhibiteur de l'APN, le PC18. Le PC18, injecté par voie i.c.v. (10-100µg), en provoquant l'accumulation d'AngIII endogène, induit une augmentation dose-dépendante de la PA. La spécificité d'action du PC18 sur le métabolisme de l'AngIII est démontrée par l'abolition de son effet presseur en présence d'EC33 ou d'un antagoniste des récepteurs angiotensinergiques de type 1 (AT1).

En conclusion, ces données montrent que l'AngIII, et non l'AngII comme ceci est établi à la périphérie, est l'un des principaux peptides effecteurs du SRA cérébral, exerçant un effet stimulateur tonique sur le contrôle central de la PA. L'APA, responsable de la formation de l'AngIII cérébrale, pourrait ainsi constituer une cible thérapeutique potentielle justifiant le développement d'inhibiteurs d'APA comme antihypertenseurs à action centrale (Réaux, Fourmié-Zaluski, David, Zini, Roques, Corvol et Llorens-Cortès, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93 : 13415-13420, 1999).

2. Travaux en projet

Mise au point d'un inhibiteur d'APA de haute affinité, sélectif, et passant la barrière hématoencéphalique : effet d'un traitement aigu ou chronique sur les fonctions cardiovasculaires

2. Récepteurs de l'AngII / AngIII de type-1 (AT_{1A} et AT_{1B})

A - Identification dans l'antéhypophyse du phenotype des cellules endocrines exprimant les récepteurs AT_{1B}

Afin d'identifier dans quel type cellulaire de l'adénohypophyse de rat mâle (somatotrope, corticotrope, lactotrope, thyrotrope, gonadotrope) sont exprimés les récepteurs AT_{1B}, nous avons effectué un double marquage du tissu hypophysaire en utilisant une ribosonde radioactive spécifique de la séquence du récepteur AT_{1B} et des anticorps dirigés respectivement contre chacune des hormones hypophysaires. Environ 30 % de la totalité des cellules expriment ce récepteur. Ces cellules sont à 80 % lactotropes et à 20 % corticotropes. aucune expression du récepteur AT_{1B} n'a pu être observée dans les cellules somatotropes, mammosomatotropes, gonadotropes ou thyrotropes. L'AngII/AngIII synthétisée dans les cellules gonadotropes est donc libérée dans l'antéhypophyse où elle stimule la sécrétion de prolactine et d'ACTH, par un effet paracrine direct via les récepteurs AT_{1B} synthétisés dans les cellules lactotropes et corticotropes (Lenkei, Nuyt, Grouselle, Corvol, Llorens-Cortès, *Endocrinology*, 1999, 140 : 472-477).

B - Récepteurs AT_{1A} dans la branche large ascendante corticale de rein de rat (CTAL) : Rôle de la phosphatidyl 3-kinase (PI-3K) sur les augmentations de calcium intracellulaire et de production de CO₂ métabolique induites par l'angiotensine II

L'angiotensine II (Ang II) est couplée à différentes voies de signalisation qui conduisent à la mobilisation du calcium intracellulaire. Dans le CTAL, nous avons récemment mis en évidence que l'Ang II, via le sous-type de récepteur AT_{1A}, active plusieurs enzymes telles que la tyrosine kinase, la phospholipase C et la protéine kinase C (PKC). Cependant, dans ce segment de néphron le rôle de la PI-3K, qui est une enzyme essentielle de la fonction cellulaire, est méconnu. Les principaux objectifs de ce travail étaient donc d'étudier dans le CTAL micro-disséqué, 1) le rôle de la PI-3K sur les augmentations de calcium intracellulaire induites par l'Ang II, 2) la signification physiologique de cette voie de signalisation en mesurant la production de CO₂ métabolique induite par l'Ang II à partir d'un substrat uniformément marqué au carbone 14 ([U¹⁴C]-lactate), cette production étant connu pour refléter l'activité de transport du NaCl et enfin 3) la participation de la PKC dans cette voie.

Les courbes « dose-réponse » effectuées en présence ou en absence de 50 μM de LY294002, un inhibiteur spécifique de la PI-3K, montrent que les réponses calciques maximales obtenues avec 100 nM d'Ang II sont significativement diminuées (319 ± 29 (n=7) *vs* 112 ± 13 (n=7) nM, $p < 0,01$) alors que les EC_{50} restent inchangées. Par ailleurs, cette inhibition d'environ 50 % des réponses calciques maximales par le LY294002 est observée en présence et en absence de calcium externe, indiquant que la PI-3K régule à la fois la mobilisation du calcium intracellulaire et l'influx du calcium extracellulaire. Lors d'une étude précédente, nous avons montré que la plus grande partie du métabolisme oxydatif dans le CTAL est directement couplé au transport actif de Na^+ , puisqu'il est inhibé par plus de 50 % soit avec 1 mM d'ouabaïne (un inhibiteur de la $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$) soit avec 0,1 μM de furosemide (un inhibiteur du cotransporteur $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2 Cl}^-$). Dans ce travail, nous montrons que 100 nM d'Ang II induisent une augmentation ouabaïne- et furosemide-sensible de la production de CO_2 métabolique de $2,3 \pm 0,2$ (n=10) à $3,6 \pm 0,3$ (n=12) pmoles. $\text{mm}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, $p < 0,01$. Cette stimulation de la production de CO_2 induite par l'Ang II est abolie par 1 μM de losartan (un antagoniste du récepteur AT_1), par 50 μM de LY294002 et aussi par 1 μM de bisindolylmaléimide I (un inhibiteur de la PKC).

En conclusion, ces résultats montrent que dans le CTAL, l'Ang II médie des augmentations de calcium dépendantes de l'activité PI-3K et induit une régulation concertée de la $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ et du cotransporteur $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2 Cl}^-$ via une voie de signalisation impliquant la PI-3K et la PKC.

3. Recherche de ligands endogènes de récepteurs orphelins

A - Objectif

Le développement des techniques de clonage a permis d'isoler un grand nombre de récepteurs couplés aux protéines G (GPCRs) dont le ligand endogène est encore inconnu (récepteurs orphelins). Les GPCRs orphelins constituant d'excellentes cibles thérapeutiques, il devient essentiel d'élucider leurs fonctions via l'identification de leurs ligands endogènes. Seuls 8 ligands de GPCRs orphelins humains, parmi les 140 qui ont été clonés, ont été identifiés à ce jour en utilisant comme méthode de criblage la production de seconds messagers. L'inconvénient majeur de cette approche réside dans la difficulté à prévoir la voie de signalisation utilisée par le récepteur orphelin. De plus, cette démarche implique également que le récepteur d'intérêt soit couplé à une cascade de seconds messagers dans les systèmes de transfection hétérologue dans lesquels ils sont exprimés. Finalement, la présence dans la cellule hôte, de nombreux GPCRs endogènes, peut interférer dans la mesure des seconds messagers. Devant ces difficultés, nous avons été amenés à développer un nouveau procédé de criblage pour l'identification de ligands endogènes de récepteurs orphelins.

B - Mise au point d'un nouveau procédé de criblage*Travaux réalisés*

Ce nouveau procédé met à profit la propriété qu'ont la plupart des GPCRs de s'internaliser sous l'action de ligands agonistes. Cette méthode consiste à 1) étiqueter un récepteur orphelin avec une protéine autofluorescente (EGFP) ; 2) exprimer ce récepteur à la surface de cellules eucaryotes ; 3) mettre ces cellules en contact avec des fractions HPLC purifiées d'un extrait de tissu ; 4) visualiser et quantifier en microscopie confocale l'internalisation du récepteur. En réalisant plusieurs étapes de purification et de tests d'internalisation successifs, il devient possible d'isoler la fraction contenant le peptide pur et de séquencer celui-ci. (Dépot d'un brevet INSERM/Institut McGill)

Afin de valider cette approche et de déterminer sa sensibilité, nous avons utilisé des cellules CHO exprimant de façon stable le récepteur NT1 de la neurotensine (NT) couplé à l'EGFP. La NT exogène appliquée sur ces cellules entraîne une internalisation dose-dépendante des complexes récepteurs-ligands, avec une EC50 de 1 nM. Si l'on expose ces cellules à des fractions purifiées par HPLC d'un extrait de cerveaux de grenouille, on observe une internalisation pour seulement 4 des 120 fractions testées (fractions 15, 16, 17,18). La présence du ligand endogène du récepteur NT1, la NT, dans ces fractions est confirmée par la production d'inositol-phosphates induite par ces fractions dans les cellules CHO NT1-EGFP et par leur immunoréactivité positive pour la NT. (colls. avec le Lab. d'H. Vaudry, INSERM U413 et le Lab. d'A. Beaudet, Institut McGill, Montréal, Canada). Nous avons ensuite utiliser la totalité de la fraction 15 restante que nous avons soumise à une seconde étape de purification par HPLC. Nous avons obtenu 60 fractions. Parmi celles-ci, l'une d'entres-elles était immunoréactive pour la neurotensine. Cette fraction a été soumise à une troisième purification par HPLC et quatre fractions ont été obtenues F1, F2, F3, F4), correspondantes à quatre pics bien définis (détection UV), supposés ne contenir qu'un seul peptide. Seule la fraction F4 s'est révélée immunoréactive pour la neurotensine et produisait l'internalisation du récepteur NT1-EGFP. Le séquençage N-terminal du peptide contenu dans cette fraction a révélé son identité avec la neurotensine.

Parallèlement une méthode de quantification de l'internalisation a été développée. Elle consiste à effectuer une analyse numérique de l'image en utilisant les logiciels NIH Image, Microsoft Excel 5.0 et deux logiciels macros développés dans le laboratoire.

En conclusion ces travaux démontrent que le procédé d'internalisation décrit ci-dessus est un moyen direct, spécifique, fiable, d'une grande sensibilité (de l'ordre du nanomolaire), permettant d'identifier, dans un échantillon de tissu, le ligand endogène d'un récepteur peptidique capable de s'internaliser. Ce procédé

pourra être, en outre, utilisé comme biosenseur permettant de détecter dans un liquide biologique, la présence d'une substance capable de se lier sur le récepteur.

Perspectives

Nous voulons poursuivre ce programme en appliquant cette nouvelle méthodologie à la recherche :

1) de ligands endogènes de récepteurs orphelins au sein d'un échantillon de tissu ou d'un liquide biologique ;

2) d'agonistes ou d'antagonistes d'un récepteur connu ou orphelin capable de s'internaliser au sein d'une banque de composés peptidiques ou non peptidiques.

C - Rôle physiologique de l'homologue murin du récepteur apj humain dont le ligand endogène est un nouveau peptide l'apeline

Travaux réalisés

L'apeline, un nouveau peptide récemment isolé à partir d'un extrait d'estomac de bœuf, a été identifié comme étant le ligand endogène du récepteur APJ humain. En partant d'ARNm de noyau supraoptique de rat puis en utilisant une banque d'ADNc de cerveau de rat, nous avons isolé un ADNc codant pour un récepteur à 7 domaines transmembranaires couplé aux protéines G, composé de 377 acides aminés et possédant 88 % d'identité de séquence en acides aminés avec le récepteur APJ humain et avec le récepteur de l'AngII/AngIII type-1A.

Dans un premier temps, nous avons établi une lignée stable eucaryote (cellules CHO) exprimant ce récepteur, étiqueté dans sa partie C-terminale avec un mutant de la protéine fluorescente sauvage « Green Fluorescent Protein » (EGFP) permettant ainsi de visualiser son expression membranaire. Afin de confirmer que le récepteur cloné correspond au récepteur de l'apeline, nous avons évalué la capacité de différents fragments d'apeline synthétiques à activer ce récepteur en mesurant leurs effets sur la production d'AMPc dans les cellules CHO surexprimant ce récepteur. L'apeline 17 (K17F : Lys-Phe-Arg-Arg-Gln-Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys-Gly-Pro-Met-Pro-Phe) et l'apeline 13 (pE13F : pGlu-Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys-Gly-Pro-Met-Pro-Phe) inhibent de manière dose-dépendante la production d'AMPc induite par la forskoline (EC50 de l'ordre du nanomolaire) tandis que les fragments R10F (Arg-Leu-Ser-His-Lys-Gly-Pro-Met-Pro-Phe) et G5F (Gly-Pro-Met-Pro-Phe) sont inactifs. Dans un second temps, par une technique de double marquage combinant l'immunohistochimie et l'hybridation *in situ*, nous avons mis en évidence pour la première fois que l'ARNm du récepteur de l'apeline est exprimé dans les neurones magnocellulaires vasopressinergiques du noyau supraoptique dans le cerveau de rat. Ces résultats nous ont amenés à injecter par voie intracérébroventriculaire (i.c.v.) les fragments K17F et pE13F chez la souris vigile afin de déterminer les effets de ces fragments sur la sécrétion

de vasopressine (AVP). Les fragments K17F et pE13F diminuent de manière dose-dépendante la sécrétion basale d'AVP mais également la sécrétion d'AVP induite par une déshydratation de 48 heures. Enfin, l'effet du pE13F a été testé sur la pression artérielle (PA) et sur le rythme cardiaque chez des rats normotendus anesthésiés. L'injection i.c.v. de pE13F n'a aucun effet sur la PA alors qu'injecté par voie intraveineuse il diminue la PA et augmente le rythme cardiaque.

En conclusion, ces travaux montrent que le récepteur de l'apeline est présent dans le cerveau de rat et plus particulièrement dans les neurones magnocellulaires vasopressinergiques. Par conséquent, l'effet inhibiteur de l'apeline (K17F) sur la sécrétion d'AVP est un effet direct médié par ces récepteurs. Finalement, ces récepteurs seraient impliqués à la périphérie, et non au niveau central, dans la régulation de la PA suggérant un rôle de l'apeline dans le contrôle des fonctions cardiovasculaires et de l'homéostasie hydrosodée.

Travaux en projet

1) Étude de l'internalisation du récepteur apeline de rat ; 2) Distribution des neurones apelinergiques dans le cerveau de rat adulte

VI — FONCTIONS MOLÉCULAIRES ET SIGNALISATION DES RÉCEPTEURS MEMBRANAIRES DES PEPTIDES VASOACTIFS ET DE L'INSULINE

Équipe : E. CLAUSER, G. ASSIE, C. AUZAN, N. BENHAMOUDA, S. BARDIN, S. CONCHON, C. DUGOURD, S. MISEREY, C. MONNOT, C. PARNOT, B. SAUBAMEA

L'activité du groupe a porté sur l'analyse du fonctionnement moléculaire des récepteurs membranaire de peptides vasoactifs et de l'insuline. Ces études se poursuivent par l'analyse des interactions protéiques moléculaires de ces récepteurs et de leurs voies de signalisation avec des techniques de biologie moléculaire et cellulaire et de biophysique.

1. Les récepteurs aux peptides vasoactifs

Les récepteurs de l'AngII (AT1 humain, AT_{1A}, et AT_{1B} de rat, AT² de rat), qui nous servent de modèle mais aussi de la vasopressine (V1a, V1b et V2) et de l'endotheline (ETA et ETB) sont des récepteurs heptatransmembranaires couplés à des protéines G, qui ont été clonés. Grâce aux ADNc de ces récepteurs (offerts ou recloneés au laboratoire), nous avons étudié la pharmacologie moléculaire, certains rapports structure-fonctions, les interactions protéiques et la signalisation de ces récepteurs par différentes approches.

* Nous avons développé plusieurs modèles d'étiquetage du récepteur AT_{1A} de rat en l'absence d'anticorps spécifiques contre cette protéine. La réalisation d'une

protéine de fusion récepteur AT_{1A}-EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein) permet l'expression d'un récepteur fonctionnel, facilement identifiable par Western blot, immunoprécipitation et histochimie. Nous avons pu ainsi analyser la colocalisation membranaire du récepteur et de sa protéine Gq/11 et l'évolution de leurs distributions subcellulaires lors de la liaison au récepteur de composés agonistes ou antagonistes.

* Ces récepteurs étiquetés fonctionnels nous permettent de développer nos travaux de recherche dans 3 directions complémentaires :

— l'étude directe de la dimérisation homologue et hétérologue du récepteur AT₁ ;

— l'étude des voies de signalisation du récepteur AT₁ et en particulier la voie PI3kinase/Akt ;

— l'analyse des interactions protéine-protéine mises en évidence par co-immunoprécipitation et FRET entre le récepteur AT₁ et d'autres protéines de signalisation, de désensibilisation et de trafic.

* Ces travaux en cours sont complétés par le clonage par double hybride et une autre technique chez la levure de nouvelles protéines interagissant avec les segments intracellulaires du récepteur AT₁.

* Parallèlement à ces travaux nous nous intéressons aux mécanismes d'activation du récepteur AT₁. Nous avons identifié des mutations activant de façon constitutive ce récepteur à l'aide d'une banque mutationnelle du récepteur AT₁ et le criblage de cette banque par un test fonctionnel d'activation constitutive. De tels mutants constitutivement actifs seront exprimés dans la surrenale d'animaux transgéniques afin de juger de leur rôle tumorigène.

* Enfin et dans ce cadre de la tumorigénèse surrenale, nous avons entrepris l'étude des transcriptomes de la cortico-surrenale normale (glomérulée) et tumorale (adénome de Conn) par la technique SAGE mise au point au laboratoire.

Certains aspects de ces travaux (dimérisation, interactions protéiques et activation constitutive) seront étendus à d'autres récepteurs, comme ceux de la vasopressine clonés au laboratoire.

2. Récepteur de l'insuline

L'analyse des rapports structure-fonction du récepteur de l'insuline s'est poursuivie par l'étude du rôle du domaine transmembranaire du récepteur dans la transmission du signal et la dimérisation avec 2 approches :

* Le remplacement du domaine transmembranaire par les domaines équivalents de plusieurs protéines ou récepteurs membranaires (récepteur EGF, oncoprotéine neu, glycophorine etc.), ce qui entraîne des modifications de dimérisation et donc de signalisation du récepteur (collaboration avec P. HUBERT (INSERM U338, Strasbourg).

* L'inversion de la séquence du domaine transmembranaire du récepteur de l'insuline dans la biosynthèse, le fonctionnement et la signalisation des formes courte (hIRA) et longue (hIRB) du récepteur.

Enfin et dans le cadre d'une collaboration avec A.F. BURNOL (CRI CNRS, Laboratoire de J. GIRARD à Meudon) nous avons étudié le rôle fonctionnel d'une protéine appelée Grb14 interagissant avec le RI.

VII — GÉNÉTIQUE MOLÉCULAIRE DE L'HYPERTENSION ARTÉRIELLE HUMAINE

Équipe : X. JEUNEMAÎTRE, A.-M. HOUOT, A.-P. GIMENEZ-ROQUEPLO, J. CÉLÉRIER, S. DISSE-NICODEME, I. DESITTER, P.-F. PLOUIN

1. Génétique moléculaire et analyse structure-fonction de l'angiotensinogène

Suite à nos travaux antérieurs montrant l'implication du gène de l'angiotensinogène humain dans l'hypertension artérielle essentielle, nous avons entrepris une analyse approfondie biochimique des variants moléculaires du gène de l'angiotensinogène identifiés chez l'homme et leur association avec différentes formes d'hypertension artérielle.

Un des problèmes posés est celui de la fonctionnalité du polymorphisme M235T, associé à une élévation modeste mais significative de la concentration plasmatique de la protéine. L'expression *in vitro* en cellules eucaryotes d'angiotensinogène recombinant muté n'a pas montré d'anomalie d'expression et de sécrétion, ni de modification des constantes cinétiques de sa réaction avec la rénine. Par contre, nous avons pu montrer la présence d'un pont disulfure entre les Cys 18 et 138 de la protéine mature et l'implication des Cys 232 et 308 dans la formation d'hétéropolymères *in vitro*. Cette formation d'hétéropolymères *in vitro* est modifiée par la présence ou l'absence d'une Met en position 235, suggérant un rôle possible du polymorphisme M235T *per se*, la vitesse de génération d'AngI par la rénine étant environ 7 fois moins rapide pour l'hétéropolymère d'angiotensinogène que pour l'angiotensinogène monomérique.

L'impact fonctionnel *in vivo* du polymorphisme M235T a été analysé en interaction avec la prise d'estrogènes. Sur une population faisant l'objet d'un suivi longitudinal, nous avons pu mettre en évidence une association avec des taux plasmatiques plus bas de rénine, confirmant l'effet de rétrocontrôle de l'augmentation de production d'angiotensine II. Cette réadaptation du système rénine angiotensine est encore plus caricaturale après stimulation estrogénique chez 12 sujets normovolontaires. L'effet plus marqué de la stimulation chez les sujets porteurs du génotype TT235 par rapport aux MM235, confirme l'intérêt de ce marqueur.

Nous avons également pu analyser le rôle des différents sites de glycosylation de l'angiotensinogène. Le site N¹⁴ est important dans la cinétique de la réaction enzymatique avec la rénine. Chaque site de glycosylation est porteur de charges sucrées et l'ensemble est à l'origine de l'hétérogénéité de la protéine en migration SDS-PAGE. Enfin, la purification de diverses formes d'angiotensinogène recombinant nous a permis de mettre en évidence la possibilité d'un clivage C-terminal de la molécule, qui s'apparente au clivage observé pour d'autres serpins.

2. Étude de gènes candidats dans l'HTA essentielle

Le canal Na épithélial amiloride-sensible et ses partenaires

Le canal Na épithélial sensible à l'amiloride (ENaC) contrôle la réabsorption finale du Na au niveau du tube contourné distal. Il est constitué de trois sous-unités α , β et γ toutes nécessaires à sa fonction. Des délétions portant sur la partie C-terminale des sous-unités β et γ sont responsables d'une augmentation du courant Na au niveau de la cellule tubulaire distale et de formes rares mais caricaturales d'HTA avec inflation hydrosodée et rénine basse (syndrome de Liddle). L'hypothèse que nous avons formulée était celle de la présence de mutations sur l'une ou plusieurs des sous-unités de ENaC dans l'HTA essentielle. Sur le plan moléculaire, la recherche consistait en un screening de chacun des gènes des 3 sous-unités sur plusieurs groupes d'hypertendus d'origine ethnique différente, la fonctionnalité de chacune des mutations potentielles devant être testée essentiellement par injections d'ARNc dans des œufs de Xénopus. Plusieurs polymorphismes ont été trouvés, la plupart correspondant à des mutations faux-sens situées dans la partie C-terminale des sous-unités β et γ . Cependant, il n'existe pas à l'heure actuelle d'arguments forts suggérant la fonctionnalité de ces polymorphismes. Il est à noter que le polymorphisme W493R de ENaC semble de fréquence équivalente (4 %) chez 284 sujets hypertendus caucasiens et 182 témoins normotendus. Par contre, son expression en œufs de Xénope montre des résultats divergents d'un laboratoire à un autre, qui sont en cours de finalisation.

Serum Glucocorticoid Kinase (SGK), Isoformes de Nedd-4, protéines à domaine WW

Plusieurs protéines intracytoplasmiques peuvent participer à la régulation de ENaC et donc à la régulation du bilan hydrosodé. La Serum Glucocorticoid Kinase (SGK) est une protéine kinase induite par l'aldostérone exerçant un effet positif et rapide sur l'activité de ENaC. Deux isoformes de Nedd-4 ainsi que plusieurs protéines à domaine double tryptophane (WW) interagissent avec la partie C-terminale des sous-unités de ENaC participant ainsi à la régulation de leur dégradation. Notre stratégie est d'effectuer une analyse moléculaire de celles-ci sur un panel de sujets hypertendus dont le profil tensionnel, biologique et

hormonal fait fortement suspecter une réabsorption excessive de sodium. Cette étude systématique est en cours.

Le récepteur V1 de la vasopressine

La vasopressine est une hormone majeure de réabsorption de l'eau au niveau du tube collecteur rénal. Elle agit aussi sur ENaC à court et moyen terme pour influencer la réabsorption rénale de sodium. Nous avons pris avantage d'une collaboration avec le Pr M Thibonnier (Cleveland, USA) et de son expertise dans ce domaine, pour effectuer une étude de liaison et d'association entre le gène du récepteur V1 de la vasopressine. Des séquences microsatellites ont été identifiées et analysées sur plus de 500 paires de sujets hypertendus. Cette analyse de liaison n'a pas montré d'excès de concordance entre les allèles portés par les fratries hypertendues, suggérant l'absence de mutation fréquente de ce gène à l'origine de l'HTA dite essentielle.

3. Étude de phénotypes intermédiaires chez des fratries hypertendues

L'étude phénotypique détaillée de paires de germains hypertendus entreprise depuis 1994 a pour objectif l'étude de la liaison, par la méthode des germains affectés, entre des gènes candidats et des phénotypes intermédiaires impliqués dans la régulation de la pression artérielle (système rénine-angiotensine, système kalicréine-kinine, réponse au sel, sécrétion d'aldostérone, contre-transport Na/Li).

Nous avons pu montrer des relations familiales positives sur la concentration plasmatique de rénine dans des conditions standardisées de régime salé ainsi que sur la réponse de la sécrétion d'aldostérone à la perfusion d'angiotensine II, et de l'excrétion de cortisol urinaire. D'autres phénotypes dont l'héritabilité a été suggérée dans la littérature vont être étudiés : baisse tensionnelle sous déplétion sodée, syndrome d'hypertension et dyslipidémie. Des relations fortes ont été retrouvées entre la concentration plasmatique de LDL-cholesterol et la réponse tensionnelle à l'administration aiguë d'angiotensine II. Des relations génotype-phénotype sont effectuées pour chacun des gènes codant pour les phénotypes intermédiaires correspondants. L'analyse du gène du récepteur de type 1 de l'angiotensine II est en cours, en relation avec ces systèmes. Le polymorphisme M235T du gène de l'AGT est très significativement associé au phénotype de non-modulation.

Nous avons également poursuivi une étude de génétique moléculaire du système kalicréine-kinine, constitué d'une cascade enzymatique aboutissant à la génération de peptides vasodilatateurs et natriurétiques, antagonistes du système rénine-angiotensine. Une relation négative existe entre la pression artérielle et le niveau d'excrétion urinaire de kalicréine dont environ 50 % de la variance est génétiquement déterminé. L'étude d'un marqueur microsatellite du kininogène

(substrat du système) ne montre pas de liaison génétique avec l'hypertension artérielle essentielle tout venant. La recherche de polymorphismes au niveau du gène de la kalllicréine rénale s'est avérée positive. Certains de ces polymorphismes sont associés avec une baisse de l'excrétion urinaire de kalllicréine. Leur impact biochimique a pu être analysé en collaboration avec l'U367 de l'Inserm.

4. Analyse d'une forme autosomique dominante d'hypertension artérielle essentielle

Le syndrome de Gordon (pseudohypoaldostéronisme de type II) est une forme d'hypertension artérielle particulièrement intéressante par sa transmission autosomique dominante, par son profil biologique (hyperkaliémie avec rénine basse) et par son profil thérapeutique (grande sensibilité aux diurétiques thiaziques, médicaments très employés dans l'HTA essentielle. L'identification de loci impliqués dans cette maladie pourrait donc ouvrir des voies de recherche très intéressantes dans l'HTA essentielle. Nous avons pu identifier quatre familles françaises dont l'analyse génétique initiale a permis d'exclure une liaison avec les chromosomes 1 et 17, préalablement impliqués dans la pathologie. L'identification d'une famille de 45 individus dont 15 sujets atteints nous a permis d'effectuer un screening complet du génome et d'identifier un 3^o locus (PHA2-C) à l'origine de la maladie. L'identification du gène responsable est en cours par le clonage et l'analyse des gènes exprimés de la région.

5. Génétique d'autres maladies cardiovasculaires

Nous avons aussi débuté depuis 3 ans (projet PHRC-94) la collection de familles atteintes de **prolapsus valvulaire mitral idiopathique** (maladie de Barlow). Cette pathologie, touchant environ 5 % de la population adulte est le plus souvent bénigne mais peut se compliquer d'insuffisance mitrale, d'endocardite, de troubles du rythme cardiaque et plus rarement de mort subite. Nous avons pu mener à bien l'identification d'une première localisation de la maladie par l'analyse de 370 marqueurs répartis sur l'ensemble du génome à partir de 4 grandes familles atteintes. L'intervalle de liaison est actuellement réduit à 7 centimorgans et peut permettre l'analyse de gènes candidats de la région.

La dysplasie fibromusculaire (DFM) est une artériopathie systémique d'origine inconnue, à prédominance féminine, touchant les artères musculaires de moyen calibre en particulier les atteintes rénales et cérébrales. Nous avons effectué en 1995-6 un effort systématique d'évaluation familiale de la DFM à partir de plus de 100 patients atteints de DFM et avons identifié environ 10 % de cas familiaux. Des premières études moléculaires n'ont pas permis de mettre en évidence une relation avec certains gènes de la matrice vasculaire (COL3A1, Elastine). Nous poursuivons l'analyse de cette pathologie avec en particulier la recherche d'une amélioration de la caractérisation phénotypique de l'atteinte

vasculaire — des résultats prometteurs ont été obtenus par échographie de haute résolution en collaboration avec l'unité 337 (S Laurent, P Boutouyrie ; Projet financé par la Société Française d'Hypertension Artérielle).

BIBLIOGRAPHIE

1999

LENKEI Z., NUYT A.-M., GROUSELLE D., CORVOL P. and LLORENS-CORTES C. Identification of endocrine cell populations expressing the AT_{1B} subtype of angiotensin II receptors in the anterior pituitary. *Endocrinology* 140 : 472-477, 1999.

HUBERT C., GASC J.-M., BERGER S., SCHUTZ G. and CORVOL P. Effects of mineralocorticoid receptor genes disruption on the components of the renin-angiotensin system in 8-day old mice. *Mol. Endocrinol.* 13 : 297-306, 1999.

MICHAUD A., CHAUVET M.-T. and CORVOL P. The N domain of angiotensin I-converting enzyme as assessed by structure-function studies of its highly selective substrate, N-Acetyl-Seryl-Aspartyl-Lysyl-Proline. *Biochem. Pharmacol.* 57 : 611-618, 1999.

CONCHON S., MISEREY S., PARNOT C., MONNOT C., CORVOL P. and CLAUSER E. Several interesting phenotypes of the AT₁ receptor produced by site-directed mutagenesis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 10 : S8-S14, 1999.

KORTH P., BOHLE R.M., CORVOL P. and PINET F. Cellular distribution of endothelin-converting enzyme-1 in human tissues. *J. Histochem. Cytochem.* 47 : 447-462, 1999.

DIVE V., COTTON J., YIOTAKIS A., MICHAUD A., VASSILIOU S., JIRACEK J., VAZEUX G., CHAUVET M.-T., CUNIASSE P. and CORVOL P. RXP407, a phosphinic peptide, is a potent inhibitor of angiotensin I converting enzyme able to differentiate between its two active sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96 : 4330-4335, 1999.

PERSU A., COSCOY S., HOUOT A.-M., CORVOL P., BARBRY P. and JEUNEMAITRE X. Polymorphisms of the γ subunit of the epithelial Na⁺ channel in essential hypertension. *J. Hypertens.* 17 : 639-645, 1999.

NUYT A.-M., LENKEI Z., PALKOVITS M., CORVOL P. and LLORENS-CORTES C. Ontogeny of angiotensin II type 2 receptor mRNA expression in fetal and neonatal rat brain. *J. Comp. Neurol.* 407 : 193-206, 1999.

PELLETIER J., AUZAN C., DAVEAU A., CLAUSER E. and CHEMINEAU, P. Sheep 5HT₂ receptor : partial cloning of the coding sequence and mRNA localization by in situ hybridization in sheep hypothalamus. *Cell Tissue Res.* 295 : 231-239, 1999.

JUNOT C., MÉNARD J., GONZALES M.-F., MICHAUD A., CORVOL P. and EZAN E. In vivo assessment of captopril selectivity of angiotensin I-converting enzyme

inhibition : differential inhibition of acetyl-ser-asp-lys-pro and angiotensin I hydrolysis. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 289 : 1257-1261, 1999.

VANTYGHM M.-C., RONCI N., PROVOST F., GHULAM A., LEFEBVRE J., JEUNEMAITRE X. and TABARIN A. Aldosterone producing adenoma without hypertension : a report of two cases. *Eur. J. Endocrinol.* 141 : 279-285, 1999.

FIQUET-KEMPF B., GRIMBERT P., PANNIER-MOREAU I., VUAGNAT A., JEUNEMAITRE X. and PLOUIN P.-F. La dysplasie fibromusculaire des artères rénales. *Néphrologie* 20 : 13-18, 1999.

JEUNEMAITRE X., GIMENEZ-ROQUEPLO A.-P., CELERIER J. and CORVOL P. Angiotensinogen variants and human hypertension. *Current Hypertension Reports* 1 : 31-41, 1999.

CORVOL P., PERSU A., GIMENEZ-ROQUEPLO A.-P. and JEUNEMAITRE X. Seven lessons from two candidate gens in human essential hypertension. *Hypertension* 33 : 1324-1331, 1999.

FISHER N.D.L., HURWITZ S., FERRI C., JEUNEMAITRE X., HOLLENBERG N.K. and WILLIAMS G.H. Altered adrenal sensitivity to angiotensin II in low-renin essential hypertension. *Hypertension* 34 : 388-394, 1999.

DISSE S., ABERGEL E., BERREBI A., LE HEUZEY J.-Y., DIEBOLD B., GUIZE L., CARPENTIER A., CORVOL P. and JEUNEMAITRE X. First mapping of autosomal dominant myxomatous mitral valve prolapse to chromosome 16p12-21. *Am. J. Hum. Genet.* 65 : 1242-1251, 1999.

GERMAIN S., BONNET F., FUCHS S., PHILIPPE J., CORVOL P. and PINET F. Dissection of silencer elements in first intron controlling the human renin gene. *J. Hypertens.* 17 : 899-905, 1999.

VALDENAIRE O., BARRET A., ROHBACHER E., SCHWEIZER A., MONGIAT F., PINET F., CORVOL P. and TOUGARD C. Two di-leucine-based motifs account for the different subcellular localization of the human endothelin-converting enzyme (ECE-1) isoforms. *J. Cell. Sci.* 112 : 3115-3125, 1999.

VALDENAIRE O., LEPAILLEUR-ENOUF D., EGIDY G., THOUARD A., BARRET A., VRANCKX R., TOUGARD C. and MICHEL J.-B. A fourth isoform of endothelin-converting enzyme (ECE-1) is generated from an additional promoter. *Molecular cloning and characterization.* *Eur. J. Biochem.* 264 : 341-349, 1999.

KEMPF H., CORVOL P. and GASC J.-M. Expression of the chicken angiotensin II receptor : Atypical pattern compared to its mammalian homologues. *Mech. Dev.* 84 : 177-180, 1999.

HUS-CITHAREL A., GASC J.-M., ZINI S., MARCHETTI J., ROQUES B., CORVOL P. and LLORENS-CORTES C. Aminopeptidase A activity and angiotensin III effects on $[Ca^{2+}]_i$ along the rat nephron. *Kidney Int.* 56 : 850-859, 1999.

ISAAC R.E., MICHAUD A., KEEN J.N., WILLIAMS T.-A., COATES D., WETSEL W.C. and CORVOL P. Hydrolysis by somatic angiotensin I-converting enzyme of

basic dipeptides from a cholecystokinin/gastrin and a LH-RH peptide extended at the C-terminus with Gly-Arg/Lys-Arg, but not from diarginyl insulin. *Eur. J. Biochem.* 262 : 569-574, 1999.

REAUX A., DE MOTA N., ZINI S., FOURNIE-ZALUSKI M.-C., ROQUES B.-P., CADEL S., CORVOL P. and LLORENS-CORTES C. PC18, a specific aminopeptidase N inhibitor, by increasing the half-life of brain angiotensin III, induces vasopressin release. *Neuroendocrinology*, 69 : 370-376, 1999.

REAUX A., FOURNIE-ZALUSKI M.-C., DAVID C., ZINI S., ROQUES B.-P., CORVOL P. and LLORENS-CORTES C. Aminopeptidase A inhibitors as potential central antihypertensive agents. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93 : 13415-13420, 1999.

DAVID C., BISCHOFF L., MEUDAL H., MOTHE A., DE MOTA N., DANASCIMENTO S., LLORENS-CORTES C., FOURNIE-ZALUSKI and ROQUES B.P. Investigation of subsite preferences in aminopeptidase A (EC 3.4.7.11, APA) led to the design of the first highly potent and selective inhibitors of this enzyme. *J. Med. Chem.* 16 : 5197-5211, 1999.

GARDIN A., AUZAN C., CLAUSER E., MALHERBE T., AUNIS D., CREMEL G., and HUBERT P. Substitution of the insulin receptor transmembrane domain with that of Glycophorin A inhibits insulin action. *Faseb J.* 13 : 1347-57, 1999.

PELLETIER J., AUZAN C., DAVEAU A., CLAUSER E. and CHEMINEAU P. Sheep 5HT₂ receptor : partial cloning of the coding sequence and mRNA localization by in situ hybridization in sheep hypothalamus. *Cell Tissue Res.* 295 (2) : 231-239, 1999.

VENTURA M.A., RENÉ P., DEKEYSER Y., BERTAGNA X & CLAUSER E. Gene and cDNA cloning and characterization of the mouse V3/V1b pituitary vasopressin receptor. *J. Mol. Endocrinol.* 22 : 251-60, 1999.

2000

GIACCHE M., VUAGNAT A., HUNT S.C., HOPKINS P.N., FISHER N.D.L., AZIZI M., CORVOL P., WILLIAMS G.H. and JEUNEMAITRE X. Aldosterone stimulation by angiotensin II : influence of gender, plasma renin and familial resemblance. *Hypertension* 35 : 710-716, 2000.

HANON O., GIRERD X., LUONG V.U., JEUNEMAITRE X., LAURENT S. and SAFAR M. Association between the apolipoprotein E polymorphism and arteries wall thickness in asymptomatic adults. *J. Hypertens.* 18 : 431-436, 2000.

CELERIER J., SCHMID G., LE CAER J.-P., GIMENEZ-ROQUEPLO A.-P., BUR D., FRIEDLEIN A., LANGEN H., CORVOL P. and JEUNEMAITRE X. Characterization of a human angiotensinogen cleaved in its reactive center loop by a proteolytic activity from Chinese Ovary cells. *J. Biol. Chem.* 275 : 10648-10654, 2000.

THIBONNIER M., GRAVES M.K., WAGNER M.S., CHATELAIN N., SOUBRIER F., CORVOL P., WILLARD H.F. and JEUNEMAITRE X. Study of human V₁-vascular

vasopressin receptor gene microsatellite polymorphisms in human essential hypertension. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 32 : 557-564, 2000.

GERMAIN S., HOWELL M., ESSLEMONT G.M. and HILL C.S. Homeodomain and winged-helix transcription factors recruit activated Smads to distinct promoter elements via a common Smad interaction motif. *Genes Dev.* 14 : 435-451, 2000.

GEORGIADIS D., VAZEUX G., LLORENS-CORTES C., YIOTAKIS A. and DIVE V. Potent and selective inhibition of zinc aminopeptidase A (EC 3.4.11.7, APA) by glutamyl aminophosphinic peptides : Importance of glutamyl aminophosphinic residue in the P1 position. *Biochemistry* 39 : 1152-1155, 2000.

ITURRIOZ X., VAZEUX G., CELERIER J., CORVOL P. and LLORENS-CORTES C. Histidine 450 is essential for catalytic activity and, with Ca²⁺, contribute to the substrate specificity of aminopeptidase A. *Biochemistry* 39 : 3061-3068, 2000.

BREVETS

Composition pharmaceutique utile pour diminuer la pression artérielle comprenant au moins un inhibiteur d'aminopeptidase A. Brevet FR n° 9800453 déposé au nom de l'INSERM le 16/01/98, demande internationale déposée le 16/01/99 — n° PCT/FR00/00. Auteurs : C. Llorens-Cortès, M-C. Fournié-Zaluski, B. Roques, P. Corvol.

Procédé de criblage utile pour identifier des ligands potentiels pour un récepteur capable de s'intérioriser. Brevet FR n° 9900588 déposé le 19/01/99 au nom de l'INSERM et de l'Université McGill. Demande internationale n° PCT/FR00/00113 déposée le 19/01/2000. Auteurs : Llorens-Cortès C., Lenkei Z., Beaudet A., Vaudry H., Chartrel N.

Composés tripeptidiques utiles à titre d'inhibiteurs sélectifs de l'aminopeptidase A et compositions pharmaceutiques correspondantes. Brevet FR n° 9900587 déposé au nom de l'INSERM et du CNRS le 20/01/99. Demande internationale n° PCT/FR00/00112 déposée le 19/01/2000. Auteurs : Fournié-Zaluski M-C., Roques B.P., David C., Bischoff L., Llorens-Cortès C.

EXPOSÉS, CONGRÈS

Monsieur Pierre Corvol a participé aux congrès et réunions suivants : Réunion sur la génétique de l'Hypertension Humaine (EURNETGEN, Amsterdam, 17 octobre 1999) ; Eur. School of Hematology (Paris, 23-25 octobre 1999) ; Conférence à Tokyo (Tokyo Med. Univ., 27-30 octobre 1999) ; Congrès International sur la Génétique des maladies Cardiovasculaires (Paris, 9-11 décembre 1999) ; Société Européenne de Cardiologie (Paris, 21 janvier 2000) ; Congrès Risk and Prevention (Paris, 24 et 25 février 2000) ; International Symposium on Angiotensin II Antagonists (Londres, 28 et 29 février 2000) ; Journée Gabriel

Richet (Paris, 10 mars 2000) ; Conférence de l'Université de Tous les Savoirs (CNAM, Paris, 11 mars 2000) ; 1^{er} Congrès national de Néphrologie (Tunis, 14 et 15 avril 2000).

Monsieur Pagano et Xavier Houard ont participé aux congrès suivants : Congrès de l'European Council for Blood Pressure and Cardiovascular Research, octobre 1999, Noorwijkerhout (Pays-Bas) prix de la meilleure communication affichée ; Colloque National sur la Protéolyse Cellulaire, Société Française de Biochimie et de Biologie Moléculaire, 5-6 avril 2000, Arcachon, communication orale ; Congrès du Groupe de Réflexion sur la Recherche Cardio-vasculaire, 18-19 avril 2000, Saint-Malo, communication affichée.

Monsieur Hervé Kempf a participé à la réunion de l'European Developmental Biology Congress (Oslo, Norvège), 19-23 juin 1999.

Monsieur Jean-Marie Gasc, Amauri Cruz et Judith Favier ont participé à l'European School of Hematology sur « Angiogenesis and Tumors » à Paris (22-25 octobre 1999).

Amauri Cruz et Judith Favier ont participé au XVII^e Congrès du Groupe de Réflexion sur la Recherche Cardiovasculaire (Saint-Malo, 18 et 19 avril 2000) et à la Cinquième Réunion du Réseau Français d'Angiogenèse (Villefranche-sur-mer, 28-29 avril 2000).

Judith Favier a participé au Congrès de la Société Française du Cancer sur « L'angiogenèse tumorale : du laboratoire au lit du malade », Paris, 1999.

Judith Favier a été invitée à donner des cours sur « L'Angiogenèse Normale et Pathologique » à la Maîtrise des Sciences Biologiques et Médicales de Pharmacologie cellulaire, Pharmacogénétique et Pharmacocinétique, Faculté de Médecine Lariboisière-Saint Louis.

Mademoiselle Florence Pinet et son équipe ont participé aux congrès suivants : IX^e Journées Européennes de la Société Française de Cardiologie, Paris (13-16 janvier 1999) ; Réunion du réseau d'angiogenèse, Lille (16-17 avril 1999) ; Congrès Biologie et Pathologie du cœur et des vaisseaux, Deauville (22-23 avril 1999) ; Endothelin 6 conference, Montréal, Canada (11-13 octobre 1999) ; European Research Conference on Blood Pressure and Cardiovascular Disease — Noordwijkhout, Hollande (15-17 octobre 1999) ; X^e Journées Européennes de la Société Française de Cardiologie, Paris (19-22 janvier 2000) ; Congrès Biologie et Pathologie du cœur et des vaisseaux, Saint-Malo (18-19 avril 2000).

Mademoiselle Florence Pinet a été invitée à donner un séminaire à l'Université de Berlin (Allemagne) (2-3 décembre 1999).

Mademoiselle Florence Pinet a séjourné 6 mois au Cardiovascular Research Center au Massachusetts General Hospital (Boston, USA) de février à août 1999.

Monsieur Éric Clauser a participé aux congrès suivants :

Conférences invitées : XV^e international congress of Nephrology, Buenos Aires, Argentine. May 2-6, 1999 ; 17^e congrès de la Société Française d'endocrinologie, Bordeaux, 6-9 octobre 1999.

Madame Claude Tougard a participé aux congrès suivants : XVII^e Congrès de la Société Française d'Endocrinologie, Bordeaux, 6-9 octobre 1999 ; 3^e réunion du Club Exocytose, Paris, 23-24 mai 2000.

Monsieur Laurent Muller a participé aux congrès suivants : 6^e Conférence Internationale sur l'Endothéline, Montréal, 10-13 octobre 1999 ; 3^e réunion du Club Exocytose, Paris, 23-24 mai 2000.

Laurent Muller a donné un séminaire à l'U.129 INSERM (ICGM-Hôpital Cochin) le 30 septembre 1999.

Madame Catherine Llorens-Cortes et son équipe ont participé aux congrès suivants :

Séminaires donnés sur invitation

En France

7 octobre 1999 : INSERM U129, Paris ; 15 novembre 1999 : CNRS UMR7631, Paris.

À l'étranger

Mars 1999 : NIMH, Bethesda, USA.

Invitation à des colloques

Gordon Conference on Angiotensin, Oxford, U.K., 8-13 août 1999 (conférencier)
8th Semmelweis Symposium Budapest, Hongrie, 4-5 novembre 1999 (conférencier). UK Biochemical Society Meeting 671, University of Leeds, U.K., 11-13 avril 2000 (conférencier)

Congrès

Keystone Symposia on Metalloproteases : Chemistry, Biology and Medicine, Tamarron, Colorado (USA), 25 février-3 mars 1999 ; 4^e Colloque de la Société des Neurosciences, Marseille (France), 25-28 mai 1999 ; 3^e Journée LARC-Neurosciences, Faculté de Pharmacie, Amiens, 8 octobre 1999 ; 29th Annual Meeting Society for Neurosciences, Miami Beach Convention Center, 23-28 octobre 1999 ; 32nd Annual Meeting of American Society of Nephrology, Miami, 1-8 novembre 1999 ; BRI Symposium : Neuropeptides at the Millenium, Miami (USA), novembre 1999 ; Journée de l'Institut de Biologie, Paris (France), 10 décembre 1999 ; Biochemical Society meeting 671, University of Leeds (United Kingdom), 11-13 avril 2000.

Monsieur Xavier Jeunemaitre et son équipe ont participé aux congrès suivants : European Meeting of Hypertension, Milan, Juin 1999 ; European Research Council for High Blood Pressure, Noordwijkhooft, octobre 1999.

Conférences invitées : Société Québécoise d'Hypertension Artérielle, Québec, janvier 1999 ; 21^e Séminaire de Cardiologie Fondamentale, Paris, mars 1999 ; Séminaire de Génétique Humaine, Dijon, avril 1999 ; 7^e Université de l'ORA,

Nice, septembre 1999 ; First International Symposium on Obesity and Hypertension. Genetic and Molecular Mechanisms, Berlin, octobre 1999 ; First International Congress on Hypertension, Fes, Maroc, Octobre 1999 ; Portuguese Society of Hypertension. Lisbonne, Portugal, novembre 1999.

ENSEIGNEMENTS

Monsieur Pierre Corvol a participé aux enseignements suivants : DEA d'Endocrinologie Moléculaire (Paris XI) ; DEA de Pharmacologie (Paris XI).

Monsieur Maurice Pagano a participé aux enseignements suivants : Enseignements de Biochimie et Biologie Moléculaire UFR Médicale Broussais-Hôtel-Dieu, Université Paris VI ; PCEM1 : cours de Biochimie métabolique et enseignements dirigés de Biochimie et Biologie Moléculaire ; PCEM2 : enseignements dirigés de Biochimie et Biologie Moléculaire ; Enseignements de Biochimie, Licence et Maîtrise de Biochimie, UFR des Sciences de la Vie, Université Paris VI ; Enseignements dirigés sur les protéines, module de Biochimie Structurale et Métabolique de la Licence de Biologie Cellulaire et de Physiologie ; Enseignements dirigés sur les protéines et l'enzymologie, certificat C2 de la Maîtrise de Biochimie.

Mademoiselle Florence Pinet est co-directeur des études du DEA de Biologie et Pharmacologie de l'Hémostase et des Vaisseaux et a participé à son enseignement. Elle fait partie du conseil d'administration du Groupe de Réflexion sur la Recherche Cardio-vasculaire : GRRC.

Madame Claude Tougard a participé aux enseignements de DEA suivants : DEA de Biologie Cellulaire et Moléculaire, Paris VI, mars 2000 ; DEA d'Endocrinologie et Interactions Cellulaires, Paris XI, avril 2000. Cours dans le cadre du Certificat de Biologie Moléculaire de la Cellule, Paris XI, janvier 2000.

Madame Catherine Llorens-Cortes a participé à l'enseignement de :

i) Pharmacologie Endocrinienne (Paris VII) : C2 pour la Maîtrise des Sciences Biologiques et Médicales et Diplôme d'Université.

ii) du DEA de Pharmacochimie Moléculaire, Pharmacologie expérimentale (B. Roques).

Monsieur Eric Clauser a participé aux enseignements suivants :

* Cours de Biochimie de 1^{re} (Biologie Moléculaire) et 2^e année (Récepteurs membranaires, signalisation et communication cellulaire) - Faculté de Médecine St-Antoine.

* DEA d'endocrinologie moléculaire (Pr Milgrom) ; DEA de pharmacologie (Dr Hanoune) ; DEA de Différenciation cellulaire et fonctions intégrées (Pr Chambaz).

* Certificats de Maîtrise (MSBM) de Biotechnologies (Paris VI) et Biologie Moléculaire de la Cellule (Paris XI).

* Coordinateur d'un projet d'école doctorale Paris VI-Paris VII associant 5 DEAs sur le thème « Physiologie et Physiopathologie ».

* Membre élu et vice-président de la CSS5 de l'INSERM.

Monsieur Xavier Jeunemaitre a participé aux enseignements suivants : Responsable de l'enseignement de Génétique à l'Université Paris VI (PCEM1, DCEM1) ; Responsable au sein de l'UFR Broussais-Hôtel Dieu du Certificat de Maîtrise SBM de Paris VI « Génétique Humaine et Comparée » ; Participation au Certificat C2 de Biologie Moléculaire (Paris V), organisé par le Pr Kaplan, au DEA de Pharmacologie Cardiovasculaire organisé par les Pr Safar et Sassard, au Diplôme Universitaire de Néphrologie Pédiatrique, Hôpital Necker.

LISTE DES DIPLÔMÉS

DEA

Céline Dugourd : DEA de Biologie Moléculaire de la Cellule (Paris XI).
Caractérisation de l'activation de la voie des protéines kinases PI-3-kinase/ AKT par le récepteur de type 1 de l'angiotensine II — Implication dans la prolifération cellulaire.

THÈSES

Hervé Kempf : Thèse de Doctorat d'Université, Endocrinologie et Interactions Cellulaires (Paris XI).

Peptides vasoactifs et développement : les endothélines et l'angiotensine dans le modèle de l'embryon de poulet.

Charles Parnot : Thèse de Doctorat d'Université, Biologie Cellulaire et Moléculaire (Paris VI).

De la biosynthèse des peptides vasoactifs à l'activation de leurs récepteurs : les exemples de l'endothéline-1 et de l'angiotensine.

MÉMOIRE

Colette Auzan : Mémoire École Pratique des Hautes Études, 29 juin 1999.
Le récepteur de l'insuline : Rôle de la structure moléculaire dans l'activation du récepteur et la transmission du signal insulinique.

