

Médecine expérimentale

M. Pierre CORVOL, professeur

Le cours de Médecine Expérimentale a traité des aspects fondamentaux de la rénine, des anti-rénine et de leurs implications en physiologie et en pathologie. La rénine a été découverte en 1898 par Tigerstedt et Bergman. Ces chercheurs montrèrent qu'un extrait salin de rein de lapin, administré par voie intraveineuse, élevait de façon marquée et prolongée la pression artérielle. C'est toutefois en 1940 que la biochimie de ce système naissait par la découverte simultanée de Page et Helmer aux Etats-Unis et de Braun-Menendez en Argentine que la rénine était une enzyme sécrétée par le rein agissant sur l'angiotensinogène pour produire l'angiotensine I. Skeggs découvrait, plus d'une quinzaine d'années plus tard, que l'angiotensine I était convertie dans le plasma en angiotensine II par une enzyme, l'enzyme de conversion de l'angiotensine I. L'angiotensine II est l'effecteur du système rénine, l'angiotensine I pouvant être considérée comme une prohormone. Les expériences de Goldblatt ont montré le rôle clé que jouait l'activation du système rénine dans l'hypertension artérielle réno-vasculaire expérimentale. Ainsi étaient découverts un système biochimique conduisant à la formation d'un des peptides les plus vasopresseurs de l'organisme et le rôle que pouvait exercer ce système en physio-pathologie.

La rénine fait partie de la famille des aspartyl-protéases qui comprend la pepsine, la chymosine, la cathepsine D, ainsi que des protéases provenant de micro-organismes (penicillopepsine, endothiapepsine, ...). On a montré récemment que des aspartyl-protéases, issues des rétrovirus, tels que celui du SIDA, ont la même structure tridimensionnelle et le même site catalytique que la rénine. La rénine est inhibée de façon compétitive par la pepstatine, inhibiteur universel de la famille des aspartyl-protéases. Elle peut être aussi inhibée de façon irréversible par des réactifs d'affinité qui vont se lier de façon covalente aux deux acides aspartiques impliqués dans le mécanisme catalytique (Asp₃₂ et Asp₂₁₅, dans la numérotation pepsine). La molécule d'eau située entre les deux acides aspartiques attaque la liaison peptidique du substrat.

Nous avons montré que l'appartenance de la rénine à la famille des aspartyl-protéases a plusieurs conséquences importantes : 1) la conception d'inhibiteurs de la rénine se fait à partir du modèle du site actif des aspartyl-protéases que l'on peut modéliser sur ordinateur. 2) Les programmes de recherches sur les inhibiteurs de la rénine peuvent conduire à des inhibiteurs d'autres aspartyl-protéases et vice-versa. 3) La structure tertiaire complète de la rénine peut être modélisée à partir des données cristallographiques connues d'autres aspartyl-protéases. 4) La maturation de la prorénine en rénine se fait selon des mécanismes qui rappellent, en partie, la maturation d'autres zymogènes des aspartyl-protéases en enzyme actif (par exemple : la maturation du pepsinogène en pepsine).

La rénine se distingue toutefois des autres aspartyl-protéases par plusieurs propriétés remarquables : 1) Son extrême spécificité puisque son seul substrat connu est l'angiotensinogène alors que les autres aspartyl-protéases hydrolysent des substrats variés. 2) Son pH optimum est voisin de la neutralité alors que celui des aspartyl-protéases est beaucoup plus acide. 3) L'absence d'auto-activation du zymogène en enzyme, à l'inverse de la maturation du pepsinogène en pepsine, par exemple. Une enzyme de maturation, non identifiée encore actuellement clive le profragment de la rénine pour donner l'enzyme active.

Le clonage moléculaire de la rénine sous-maxillaire de souris puis de la rénine rénale humaine a permis d'élucider la structure primaire de la rénine. L'enzyme est biosynthétisée sous la forme d'une pré-pro-rénine. Après hydrolyse du peptide signal (pré-peptide), la prorénine formée, qui est inactive, doit être transformée en rénine. Cette maturation intervient après le clivage d'un profragment de 43 acides aminés. Le site de clivage intervient juste après un doublet d'acides aminés dibasiques, lysyl-arginine, rappelant ainsi la maturation classique de la plupart des précurseurs hormonaux en hormones. La prorénine n'est pas totalement hydrolysée en rénine, chez l'homme. En effet, dans les conditions normales, 60 à 90 % de la rénine circule, sous la forme de « rénine inactive ». Cette rénine inactive est en fait la prorénine, ainsi que l'ont montré des expériences utilisant des anticorps dirigés contre des peptides synthétiques issus du profragment de la rénine.

La biosynthèse de la rénine chez l'homme a été étudiée essentiellement dans des tumeurs de l'appareil juxtaglomérulaire et dans des cellules chorioniques. En utilisant des expériences de biosynthèse de la rénine avec la (³⁵S)-méthionine et des expériences de chasse par un excès de méthionine froide, on a pu montrer que la prorénine était tout d'abord biosynthétisée puis transformée dans les heures qui suivaient en rénine. Des expériences de transfection par le gène codant pour la rénine dans des cellules équipées d'organelles de maturation des pro-hormones (lignée AtT-20), mais ne synthétisant pas normalement la rénine, ont confirmé les premières hypothèses tirées des expériences de cultures de cellules juxtaglomérulaires.

Il existe deux voies de routage intracellulaire de la rénine : 1) une voie aboutissant à la formation de rénine dans les granules de maturation. Cette voie est régulée par les différents secrétagogues (par ex : l'AMP cyclique) ; 2) une voie constitutive, ne passant pas par les granules de maturation, et conduisant donc à la formation de prorénine qui est immédiatement sécrétée. Cette voie n'est pas régulée. Ces données sont importantes pour comprendre les variations de rénine et de prorénine circulant dans le plasma chez l'homme. Les variations rapides de la rénine (stimulation, suppression) portent sur les taux de rénine elle-même, sans modification de la prorénine. Elles correspondent très certainement à la libération de rénine préalablement stockée dans les granules. Par contre, la mise en jeu chronique de la sécrétion de rénine aboutit à des variations des taux de prorénine et de rénine. Elle correspond à la mise en jeu de la transcription du gène.

La régulation de la sécrétion de la rénine peut être étudiée dans différents modèles : *in vivo* chez l'animal entier, *in vitro* dans des systèmes de rein perfusé, de tranches de rein ou de cellules juxtaglomérulaires en culture. Cette régulation est particulièrement complexe, faisant intervenir de nombreux récepteurs et leurs seconds messagers. Schématiquement, au niveau de l'appareil juxtaglomérulaire, existe une série de récepteurs couplés à l'adénylate cyclase et dont la mise en jeu aboutit à une augmentation de la sécrétion de rénine : récepteurs bêta-adrénergiques, récepteurs de la bradykinine, etc. La cellule juxtaglomérulaire possède aussi des récepteurs de l'angiotensine II aboutissant à une régulation négative de la sécrétion de rénine. L'élévation du calcium intracellulaire dans la cellule juxtaglomérulaire, sous l'effet de l'angiotensine II, aboutit en effet à une diminution de la sécrétion de la rénine. Il s'agit là d'un phénomène inhabituel dans le cadre des sécrétions hormonales puisque l'élévation intracellulaire de calcium aboutit, en règle générale, à l'élévation de la production de l'hormone. L'hormone natriurétique auriculaire (ANP) est, elle aussi, capable d'abaisser la production de rénine par l'intermédiaire de l'élévation du GMP cyclique intracellulaire.

La conception d'inhibiteurs de la rénine a pris un essor considérable grâce aux progrès réalisés sur la rénine et l'angiotensinogène. La découverte que la rénine est une aspartyl-protéase, la connaissance de son site actif, les premières études de cristallisation, ont permis au fur et à mesure d'obtenir des produits de plus en plus spécifiques et à haute affinité. Parallèlement, l'angiotensinogène a été purifié, séquencé et cloné. Ces recherches ont permis de définir la longueur du substrat minimum de la rénine, la spécificité des substrats vis-à-vis des sous-sites de reconnaissance de la rénine dans différentes espèces.

La pepstatine (Iva-Val-Val-Sta-Ala-Sta) a été le premier inhibiteur de la rénine. La statine (Sta), acide aminé non naturel présent dans la pepstatine, joue le rôle d'un analogue d'un état de transition de l'hydrolyse peptidique. En gardant la statine centrale et en remplaçant les acides aminés de la

pepstatine situés de part et d'autre de la statine par des acides aminés trouvés dans le substrat de l'angiotensinogène, notamment en P₂ et P₃ (His, Phe), on a pu découvrir des inhibiteurs de la rénine remarquablement spécifiques et affins pour l'enzyme. Les inhibiteurs actuels ont une constante d'inhibition de l'ordre de la nanomole pour la rénine et n'agissent pratiquement pas sur les autres aspartyl-protéases. Des molécules pseudo-peptidiques, correspondant à deux ou trois acides aminés, ont pu être récemment synthétisées et administrées chez l'animal et chez l'homme. Ces inhibiteurs abaissent la pression artérielle chez l'animal et chez l'homme en régime désodé et corrigent l'hypertension réno-vasculaire expérimentale. Toutefois plusieurs problèmes se posent encore : ces inhibiteurs passent très médiocrement la barrière digestive et ne sont pratiquement efficaces que par voie parentérale ; leur efficacité à long terme chez l'animal est inconnue. Il restera aussi à connaître leur efficacité anti-hypertensive chez l'homme et à la comparer à celle obtenue par les inhibiteurs de l'enzyme de conversion qui bloquent la transformation de l'angiotensine I en angiotensine II.

L'étude de la rénine par des techniques immunologiques a grandement progressé au cours de ces dernières années. La purification complète de la rénine humaine ainsi que la production de rénine recombinante ont permis, en effet, d'obtenir des anticorps dirigés contre la rénine et la prorénine. Ces anticorps sont actuellement utilisés dans plusieurs buts : 1) Etude immunohistologique de la rénine dans l'appareil juxtaglomérulaire normal et pathologique. 2) Dosage immunoradiométrique de la rénine dans le plasma humain. Ce dosage permet de distinguer la rénine de la prorénine en utilisant un couple d'anticorps monoclonaux spécifiques. 3) Mise en évidence de l'identité entre la rénine inactive circulant dans les liquides biologiques humains et de la prorénine en utilisant un anticorps dirigé contre le profragment de la rénine humaine (cf. plus haut). 4) Etudes d'immunisation passive et active chez l'animal de laboratoire.

Le transfert passif d'anticorps antirénine humaine chez le marmoset en régime normal ou en régime désodé, s'accompagne d'une baisse respective de la pression artérielle de l'ordre de 15 et 30 mmHg. Cet abaissement tensionnel est comparable à celui observé lors de l'administration par voie intraveineuse d'un inhibiteur peptidique de l'enzyme de conversion. Ces travaux montrent que la rénine intervient dans la régulation physiologique de la pression artérielle du marmoset et que son effet est plus marqué en régime désodé qu'en régime normosodé. L'immunisation active du marmoset par la rénine humaine entraîne un abaissement durable de la pression artérielle. Des résultats comparables sont obtenus avec l'administration d'inhibiteurs peptidiques ou pseudo-peptidiques de la rénine.

Ceci démontre l'importance du système rénine dans le contrôle de la pression artérielle dans des conditions d'apport sodé normal. Toutefois, une

maladie auto-immune, strictement localisée au niveau de l'appareil juxtaglomérulaire, se développe en quelques mois chez le marmoset, lors de l'immunisation active anti-rénine. Une nouvelle pathologie expérimentale, spécifique de l'appareil juxtaglomérulaire est ainsi créée. Des expériences similaires d'immunisation active anti-rénine peuvent être réalisées chez le rat génétiquement hypertendu. L'immunisation active de ces rats par la rénine pure de souris conduit à une normalisation de la pression artérielle en quelques semaines. Elle s'accompagne d'une suppression complète de l'activité rénine plasmatique, du taux d'angiotensine II circulant et d'un abaissement de 50 % de la production d'aldostérone. Les résultats obtenus sur le plan tensionnel sont comparables à ceux observés lors du traitement chronique des rats génétiquement hypertendus par les inhibiteurs de l'enzyme de conversion. Il sera intéressant d'étudier d'autres procédés d'immunisation antirénine qui pourraient conduire à la même efficacité sur le plan tensionnel tout en étant dénués des réactions auto-immunes néfastes au niveau de l'appareil juxtaglomérulaire.

P. C.

Programme des Séminaires.

Le cours a été complété par une série de séminaires :

— 15 janvier 1990 : M. Joël MENARD (Hôpital Broussais - Paris). « *Le passage de la médecine expérimentale à la médecine clinique à travers le système rénine-angiotensine* ».

— 22 janvier 1990 : M. Bertrand CASTRO (Sanofi, Montpellier). « *Biochimie structurale des protéases acides* ».

— 29 janvier 1990 : M. François ROUGEON (Institut Pasteur, Paris). « *Expression des protéines spécifiques de la glande sous-maxillaire des rongeurs : 1 - Régulation transcriptionnelle et post-traductionnelle de l'expression des gènes codants pour la rénine* ».

— 5 février 1990 : M. François ROUGEON (Institut Pasteur, Paris). « *Expression des protéines spécifiques de la glande sous-maxillaire des rongeurs : 2 - La glande sous-maxillaire est-elle une glande endocrine ?* ».

— 12 février 1990 : M. John MULLINS (Centre de Pharmacologie de Heidelberg, RFA). « *The development of transgenic rats for the study of the renin-angiotensin system* ».

— 26 février 1990 : M. Dino NISATO (Sanofi, Montpellier). « *Les inhibiteurs de la rénine. De la conception à la clinique* ».

— 5 mars 1990 : M. Jean-Paul CLOZEL (Hoffmann Laroche, Bâle). « *Hypertension artérielle induite par la cyclosporine. Effet du blocage du système rénine* ».

— 12 mars 1990 : M^{me} Marie-Claire GUBLER (INSERM U192, Hôpital Necker, Paris). « *Développement et morphologie de l'appareil juxtaglomérulaire humain normal* ».

— 19 mars 1990 : M. Pierre LEYMARIE (Service de Biochimie, CHU Caen). « *Rénine et prorénine ovarienne* ».

RAPPORT D'ACTIVITÉ DU LABORATOIRE

Une partie du personnel chercheur et technicien constituant l'unité 36 de l'INSERM (Pathologie Vasculaire et Endocrinologie Rénale) s'est installée dans les laboratoires de la Chaire de Médecine Expérimentale, en fin d'année 1989. L'activité proprement dite du laboratoire de la Chaire de Médecine Expérimentale a donc débuté très récemment, du fait des nécessaires aménagements du laboratoire. Un rapport détaillé de l'activité du laboratoire de la Chaire sera fourni en 1991.

BIBLIOGRAPHIE

1989

TOFFELMIRE E.B., SLATER K., CORVOL P., MENARD J. and SCHAMBELAN M. Response of plasma prorenin and active renin to chronic and acute alterations of renin secretion in normal humans. Studies using a direct immunoradiometric assay. *J. Clin. Invest.* 83 : 679-687, 1989

GAILLARD I., CLAUSER E., and CORVOL P. Structure of human angiotensinogen gene. *DNA* 8 (2) : 87-99, 1989.

BOUHNIC J., SAVOIE F., MICHAUD A., BAUSSANT T., ALHENC-GELAS F. and CORVOL P. Effect of sex hormones on plasma T-kininogen in the rat. *Life Sci.* 44 : 1859-1866, 1989.

MISUMI J., GARDES J., GONZALEZ M.F., CORVOL P. and MENARD J. Angiotensinogen's role in angiotensin formation, renin release and renal hemodynamic in isolated perfused kidney. *Am. J. Physiol.* 256 : F719-F727, 1989.

SAINT-ANDRE J.P., ROHMER V., PINET F., ROUSSELET M.C., BIGORGNE J.C. and CORVOL P. Renin and cathepsin B in human pituitary lactotroph cells. An ultrastructural study. *Histochemistry* 91 : 291-297, 1989.

COHEN-HAGUENAUER O., SOUBRIER F., VANCONG N., SERERO S., TURLEAU C., JEGOU C., GROSS M.S., CORVOL P. and FREZAL J. Regional mapping of the human renin gene to 1q32 by in situ hybridization. *Ann. Genet.* 32 (1) :16-20,1989.

LATTION A.L., SOUBRIER F., ALLEGRINI J., HUBERT C., CORVOL P. and ALHENC-GELAS F. The testicular transcript of the angiotensin I-converting enzyme encodes for the ancestral, non duplicated form of the enzyme. *FEBS Lett.* 252 : 99-104,1989.

MOLHO-SABATIER P., AIACH M., GAILLARD I., FIESSINGER J.N., FISCHER A.M., CHADEFU G. and CLAUSER E. Molecular characterization of seven ATIII variants using PCR. Identification of ATIII Charleville as an Ala 384 Pro mutation. *J. Clin. Invest.* 84 : 1236-1242, 1989.

CUMIN F., VELLAUD V., CORVOL P. and ALHENC-GELAS F. Evidence for a single active site in the human angiotensin I-converting enzyme from inhibitor binding studies with RU44403. Role of chloride. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 163 (2) : 718-725, 1989.

COEZY E., DARBY I., MIZRAHI J., CANTAU B., DONNAADIEU M.H., NUSSBERGER J., ESCHER E., CHAPNICK B. and CORVOL P. Inhibition of angiotensinogen production by angiotensin II analogues in human hepatoma cell line. *Am. J. Physiol.* 257 : C888-C895, 1989.

1990

DENOLLE T., ROHMER V., SAINT-ANDRE J.P., GUYENE T.T., GALLAND F., BIGORNE J.C., SCHAMBELAN M. and CORVOL P. Effect of circulating renin-angiotensin system on prolactin release in human. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 70 (1) : 288-292, 1990.

COEZY E., CORVOL P. and HOWLETT A.C. Involvement of a pertussis toxin-sensitive G protein in the regulation of angiotensinogen production by an angiotensin II in HepG2 cells. *Cell. Signal.* 2 (1) : 67-76,1990.

GAILLARD-SANCHEZ I., MATTEI M.G., CLAUSER E. and CORVOL P. Assignment by in situ hybridization of angiotensinogen gene to chromosome band 1q42 : the same region as human renin gene. *Human Genet.* 84 : 341-343, 1990.

EXPOSÉS

Monsieur P. Corvol a été le Président du Comité d'Organisation des 33^e Journées Internationales H.P. Klotz d'Endocrinologie Clinique qui se sont déroulées à Paris (17-18 mai 1990) ; il a participé comme conférencier à la

« Gordon Research Conference on Angiotensin II » (Oxnard, Californie, 19-23 février 1990) ; il a été invité comme « Pfizer visiting professor » à Boston (8-11 avril 1990).

Monsieur Eric Clouser a participé à l'Atelier INSERM n° 27 sur « Mécanismes de transduction et techniques de mesure des seconds messagers et protéines G » du 6-8 juin 1990 ; il a participé en tant que conférencier aux Journées H.P. Klotz.

Monsieur Florent Soubrier a été invité à l'Ecole Normale Supérieure par le Département de Génétique Moléculaire.

ENSEIGNEMENTS

Monsieur Florent Soubrier a participé à l'enseignement du DEA d'Endocrinologie Moléculaire de Paris XI et de la Maîtrise de Biologie Humaine de Paris VI.

Monsieur Eric Clouser a participé à l'enseignement des DEAs et Maîtrises suivants : DEA d'Endocrinologie - Université Pierre et Marie Curie (Paris) ; DEA de Pharmacologie Cardiovasculaire - Université Claude Bernard (Lyon) ; DEA de Biochimie - Université Pierre et Marie Curie (Paris) ; DEA Structure et Fonctionnement des Systèmes Biologiques Intégrés - Université Paris-Sud ; Maîtrise de Sciences Biologiques et Médicales - Université Paris-Sud ; Maîtrise de Sciences Biologiques et Médicale - Université Paris VII.

DISTINCTIONS

Monsieur P. Corvol a reçu la Médaille Européenne des Sociétés Britanniques d'Endocrinologie le 20 mars 1990.

Messieurs P. Corvol, F. Alhenc-Gelas et F. Soubrier ont reçu le Prix International de la Fondation SPA à Bruxelles, le 18 juin 1990.