

Médecine Expérimentale

M. Pierre CORVOL, professeur

Le cours de Médecine Expérimentale a porté sur les ectoenzymes membranaires impliquées dans le métabolisme des peptides vasoactifs. Les ectoenzymes comprennent des classes diverses : nucléotidases, cholinestérases, kinases, glycosyltransférases et peptidases. Elles sont des protéines intrinsèques, insérées dans la membrane plasmique, à orientation asymétrique et possédant des propriétés amphipathiques. Celles impliquées dans le métabolisme des peptides vasoconstricteurs ou vasodilatateurs peuvent soit convertir un précurseur peptidique en un peptide vasoactif (enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA), enzyme de maturation de la big endothéline en endothéline, soit inactiver un peptide vasoactif (endopeptidase neutre, ECA vis-à-vis de la bradykinine). John Vane a été l'un des premiers à montrer l'importance d'une ectoenzyme en physiologie cardiovasculaire, l'ECA qui métabolise l'angiotensine I, inactive, en angiotensine II, active. Par des expériences d'organes perfusés isolés, il a découvert que l'ECA pulmonaire membranaire — et non l'enzyme plasmatique — était responsable de l'essentiel de la conversion de l'angiotensine I en angiotensine II.

La localisation de ces ectopeptidases détermine, en grande partie, leurs fonctions physiologiques. La plupart d'entre elles se trouvent situées au niveau de la bordure en brosse du rein et de l'intestin d'où elles ont été individualisées et purifiées. Nombre d'entre elles se trouvent situées aussi au niveau cérébral (plexus choroïde, neurones). En outre, l'ECA et l'endopeptidase neutre sont localisées dans les cellules germinales du testicule. Enfin, plusieurs ectoenzymes ont été détectées au niveau des cellules mononucléées sanguines à un stade bien précis de la différenciation où elles pourraient jouer un rôle dans la maturation cellulaire. Ainsi les cellules prélymphocytaires B contiennent-elles de l'endopeptidase neutre (NEP) et de l'aminopeptidase A. En fin de compte, l'importance relative des ectoenzymes dans le métabolisme des peptides vasoactifs dépendra de la colocalisation de l'enzyme et du substrat, de la concentration de l'enzyme et de ses conditions de cinétique enzymatique locale, de la compétition avec d'autres substrats ou d'autres enzymes de

métabolisme, de la régulation du taux de l'enzyme et de la mise en jeu possible de voies alternes de métabolisme du peptide.

Les ectoenzymes représentent des cibles privilégiées pour la conception de médicaments. L'inhibition d'une ectoenzyme impliquée dans la génération d'un produit vasoactif, tel que l'ECA, a permis la découverte de médicaments antihypertenseurs puissants, les inhibiteurs de l'enzyme de conversion. Une autre catégorie de médicaments vasodilatateurs et antihypertenseurs est née de la synthèse d'inhibiteurs de l'endopeptidase neutre, enzyme impliquée dans la dégradation de l'hormone natriurétique auriculaire.

Les ectoenzymes sont ancrées dans la membrane plasmique par un glycosylphosphatidylinositol (dipeptidase rénale, aminopeptidase P, ...) ou par une hélice α transmembranaire. Dans ce dernier cas, le peptide est habituellement ancré en N-terminal (NEP, aminopeptidases A, N et M), à l'exception de l'ECA qui est ancrée par une hélice C-terminale. Certaines ectoenzymes circulent dans le plasma et dans les liquides biologiques. Cette solubilisation fait intervenir une phospholipase C spécifique pour celles insérées par un glycosylphosphatidylinositol ou, vraisemblablement, par protéolyse partielle pour celles insérées par une hélice transmembranaire. Ainsi, l'ECA plasmique résulte d'une protéolyse partielle aboutissant à la perte de l'extrémité C-terminale qui semble se produire dans de nombreuses cellules (cellules endothéliales, CHO, etc.).

La plupart des ectoenzymes peptidasiques sont des métalloprotéases à zinc. La coordination du zinc s'effectue par deux histidines et un acide glutamique, suivant une séquence consensus. L'acide glutamique situé à côté de la première histidine de liaison du zinc joue un rôle essentiel dans l'hydrolyse de la liaison peptidique. Ces enzymes ont en outre en commun l'absence de zymogène et d'inhibiteurs endogènes et une parenté lointaine avec la thermolysine, identité restreinte au niveau de la séquence consensus.

L'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) est le prototype des ectoenzymes membranaires. Il est actif sur de nombreux substrats : angiotensine I, bradykinine où il agit comme une carboxydipeptidase, mais il peut aussi agir comme une endopeptidase sur des substrats amidés (substance P) ou comme une tripeptidase (LH-RH). Le clonage récent de l'ECA humain d'origine endothéliale a montré l'existence d'un peptide signal N-terminal et d'une hélice α C-terminale, responsable de l'ancrage membranaire. La protéine est organisée en deux domaines hautement homologues, chaque domaine possédant la séquence consensus de coordination du zinc et le glutamate catalytique impliqué dans l'hydrolyse peptidique. Il existe une deuxième forme de l'ECA au niveau des cellules germinales testiculaires qui provient du même gène que l'ECA par transcription d'un messager correspondant à la partie C-terminale de l'enzyme de conversion endothéliale. Elle ne porte donc qu'un seul des

deux sites actifs de l'ECA. Son extrémité N-terminale correspond à un exon particulier, non transcrit dans l'enzyme endothéliale.

L'enzyme somatique se trouve au niveau des cellules épithéliales (placenta, rein, intestin, plexus choroïde), des cellules neuroépithéliales (organe sub-fornical, éminence médiane et substance noire), du tractus génital. L'ECA circule sous une forme solubilisée, ayant perdu son extrémité C-terminale, dans les liquides biologiques (sang, urine, liquide amniotique, lymphe). L'enzyme de conversion somatique est régulée par des facteurs hormonaux (glucocorticoïdes, hormones thyroïdiennes) et médicamenteux (les inhibiteurs de l'ECA augmentent le taux plasmatique et, vraisemblablement, la synthèse l'enzyme). Il existe en outre un déterminisme génétique : les études faites chez l'homme ont montré en effet une ressemblance familiale de l'ECA due à l'effet d'un gène codominant. Un polymorphisme à type d'insertion ou de délétion nucléotidique a été récemment mis en évidence dans le gène de l'ECA. Il a été possible de caractériser les individus par leur génotype et d'établir une corrélation génotype-phénotype (taux d'ECA circulant plasmatique). Ainsi les patients homozygotes pour l'insertion intragénique ont un taux d'ECA plasmatique environ deux fois plus bas que ceux homozygotes pour la délétion.

La conception d'inhibiteurs de l'ECA a constitué un progrès essentiel en pharmacologie cardiovasculaire. S.H. Ferreira avait remarqué que le venin de vipères brésiliennes contenait une substance capable de potentialiser l'effet vasodilatateur de la bradykinine. Les peptides correspondants furent isolés, analysés et s'avèrent être des inhibiteurs de l'ECA. La connaissance de la structure de ces inhibiteurs et les hypothèses faites sur la parenté entre le mécanisme d'action de l'ECA et de la carboxypeptidase A conduisirent Ondetti et coll. à synthétiser le captopril, inhibiteur actif par voie orale, en 1977. L'administration de captopril permit la normalisation de la pression artérielle du rat rendu hypertendu par hyperproduction de rénine (hypertension rénovasculaire), mais aussi de celle du rat génétiquement hypertendu, chez qui la rénine est normale à l'âge adulte. Ces inhibiteurs sont actuellement couramment utilisés comme antihypertenseurs. Plus récemment, on a montré, expérimentalement et chez l'homme, leur effet bénéfique dans l'insuffisance cardiaque. En diminuant la post-charge cardiaque, ils permettent l'amélioration du débit cardiaque et des paramètres hémodynamiques, la régression des symptômes fonctionnels et la prolongation de la survie. Ils représentent une alternative intéressante au traitement digitalo-diurétique classique. Enfin, les inhibiteurs de l'enzyme de conversion (IEC) diminuent la pression intra-glomérulaire. C'est sans doute par ce mécanisme qu'ils ont un effet bénéfique sur la microprotéinurie du diabétique. Des essais sont en cours pour apprécier l'effet à long terme des IEC sur la fonction rénale des diabétiques et des insuffisants rénaux chroniques.

Si les effets thérapeutiques bénéfiques des IEC sont à l'heure actuelle bien établis, leur mécanisme d'action reste en partie inconnu. Lors de l'administration aiguë d'IEC, il est vraisemblable que ces produits abaissent la pression artérielle et améliorent les performances cardiaques par une diminution de la production d'angiotensine II. Toutefois, une action potentialisatrice sur la bradykinine n'est pas à exclure puisqu'expérimentalement l'effet antihypertenseur des IEC est diminué par la co-administration d'un anti-bradykinine. Lors d'un traitement chronique, les IEC continuent à être efficaces mais le taux d'angiotensine II plasmatique n'est pas supprimé 24 h/24. Il persiste une production d'angiotensine II qui est peut-être le fait d'un blocage insuffisant de l'enzyme de conversion plasmatique ou tissulaire, d'une génération d'angiotensine II à un site extravasculaire que ne peut atteindre l'IEC ou de la mise en jeu de voies alternes de production d'angiotensine II. Il existe en effet plusieurs enzymes qui, à partir de l'angiotensine I, peuvent produire de l'angiotensine II ou d'autres métabolites actifs (angiotensine 2-8, angiotensine 1-7). Il sera important, pour répondre à ces questions, de comparer les différents effets des IEC à ceux des anti-rénine et des anti-angiotensine II.

L'endopeptidase neutre (NEP) est une autre métallopeptidase à zinc qui clive une variété de peptides vasoactifs notamment du côté aminé des acides aminés hydrophobes. Le clonage de la NEP humaine, de rat et de lapin révèle un haut degré d'homologie inter-espèces. L'enzyme est localisée dans le rein, le système nerveux central, le tractus génital mâle, l'intestin et les cellules lymphoblastiques. La NEP est liée à la membrane plasmique par une hélice transmembranaire située du côté N-terminal. Le peptide signal n'est pas clivé et sert à l'adressage membranaire de la protéine, comme pour les autres ectoenzymes à ancrage N-terminal. De nombreux substrats sont clivés par la NEP : kinines, enképhalines, ANP et substance P. Des inhibiteurs actifs par voie orale ont été récemment synthétisés (thiorphan) et potentialisent l'effet de l'administration exogène d'ANP (natriurèse et abaissement de la pression artérielle) et l'ANP endogène circulant. Ils ont un effet bénéfique sur l'hémodynamique cardiaque lors de l'insuffisance cardiaque expérimentale chez le chien. Ces résultats permettent d'envisager un développement thérapeutique de ces inhibiteurs chez l'homme.

Une autre ectoenzyme, non encore caractérisée, serait responsable de la conversion de la big endothéline en endothéline. L'endothéline est un peptide vasoconstricteur dont la maturation fait intervenir deux étapes de maturation. La première étape est la génération de la big endothéline à partir du précurseur peptidique (pré-endothéline). Cette étape implique une hydrolyse peptidique après une paire d'acides aminés basiques (Lys-Arg et Arg-Arg). La big endothéline n'a que le 1/300^e de l'activité biologique de l'endothéline. Elle est convertie en endothéline après clivage d'une liaison peptidique Trp-Val, inhabituelle dans le cas de la maturation prohormone-hormone. Il est vraisemblable que cette hydrolyse intervient au niveau de la membrane plasmique.

L'enzyme responsable serait une métalloprotéase non inhibée par le captopril ou par les inhibiteurs de la NEP. Elle est par contre inhibée par le phosphoramidon. Il est possible que cette étape de maturation soit limitante dans la génération du peptide actif, ce qui en fait une cible intéressante pour la conception d'inhibiteurs pharmacologiques.

La phylogénèse des ectoenzymes permet d'aborder les rapports de structure fonction de ces enzymes. Les ectoenzymes à zinc n'ont pratiquement pas de ressemblance au niveau de leurs structures primaires. Il est donc vraisemblable qu'il s'agit d'une évolution convergente avec conservation des ligands du zinc et du mécanisme d'action catalytique. Ces éléments permettent de prédire l'activité peptidasique d'une protéine à fonction inconnue et de concevoir des inhibiteurs de protéases à partir du mécanisme général d'hydrolyse de la liaison peptidique. Leur spécificité résidera dans l'interaction de l'inhibiteur avec les sous-sites de l'enzyme. Il est aussi possible de concevoir des inhibiteurs mixtes, agissant sur plusieurs ectoenzymes à zinc, comme le kélatorphane, inhibiteur de la NEP, de la dipeptidylaminopeptidase et de l'aminopeptidase N.

Les fonctions ancestrales de ces enzymes sont peut-être reflétées par l'expression de ces enzymes dans les cellules mononucléées sanguines. Quatre ectoenzymes s'avèrent être en effet des antigènes de surface membranaire des cellules mononucléées, à un stade bien déterminé de leur différenciation. L'identification des ligands de ces ectoenzymes, leur fonction précise dans la différenciation cellulaire sont autant de questions à résoudre. Enfin, certaines ectoenzymes résultent d'une duplication génique aboutissant à des enzymes bifonctionnelles. L'ECA est le seul exemple connu jusqu'à présent de peptidase à zinc à deux sites fonctionnels. D'autres ectoenzymes, les glycosydases intestinales, sont bifonctionnelles : la sucrase isomaltase résulte d'une duplication d'un gène unique qui après fusion et divergence des deux sites catalytiques code pour une seule chaîne polypeptidique. Celle-ci subit une maturation post-traductionnelle aboutissant à une enzyme à deux sous unités, l'une portant l'activité sucrase, l'autre isomaltase. Un autre exemple est fourni par la lactase phlorizine hydrolase. Cette enzyme résulte aussi d'une duplication génique aboutissant à une activité lactase et phlorizine hydrolase.

P. C.

Programme des séminaires :

14 janvier 1991 : M. J.A. KENNY (University of Leeds, United Kingdom). « Overview of cell-surface peptidases ».

21 janvier 1991 : M. J.L. POPOT (Institut de Biologie Physico-chimique, Paris). « Structure et repliement des protéines membranaires intégrales ».

28 janvier 1991 : M. Bernard ROQUES (Faculté de Pharmacie, Paris). « Généralités sur la structure et le mécanisme d'action des métallopeptidases à zinc (NEP, ACE, APN). Apport de la biologie moléculaire et des techniques de modélisation moléculaire ».

4 février 1991 : M. Michael DANIELSEN (University of Copenhagen, Denmark). « Biosynthesis of intestinal brush border enzymes ».

11 février 1991 : M. Bernard ROQUES (Faculté de Pharmacie, Paris). « Développement rationnel d'inhibiteurs des métallopeptidases à zinc. Site actif et sélectivité. Propriétés biochimiques et pharmacologiques ».

25 février 1991 : M. François ALHENC-GELAS (INSERM U36, Paris). « Enzyme de conversion de l'angiotensine : Aspect moléculaire de l'hydrolyse peptidique et de son inhibition ».

4 mars 1991 : M. Thomas UNGER (University of Heidelberg, RFA). « Mechanism of action of angiotensin I-converting enzyme inhibitors ».

11 mars 1991 : M. Jean-Charles SCHWARTZ (INSERM U109, Paris). « Ecto-peptidases responsables de l'inactivation du facteur natriurétique auriculaire et leur inhibition : perspectives thérapeutiques ».

18 mars 1991 : M. Jean-Pierre VINCENT (Institut de Pharmacologie - CNRS, Valbonne). « Découverte, caractérisation et localisation de l'endopeptidase 24-16, une nouvelle enzyme de dégradation des neuropeptides ».

RAPPORT D'ACTIVITÉ DU LABORATOIRE

I. BIOLOGIE MOLÉCULAIRE DE L'ENZYME DE CONVERSION

Equipe F. SOUBRIER, C. HUBERT, A.-M. HOUOT, P. TESTUT, S. NADEAU, J.-D. LALAU, C. ZENNARO, C. LLORENS, S. WILK

1 - Biologie moléculaire de l'enzyme de conversion (ECA)

L'enzyme de conversion de l'angiotensine I (ECA) est une dipeptidyl hydro-lase appartenant à la classe des métallo-peptidases à zinc. Sa principale activité physiologique est de transformer un décapeptide inactif, l'angiotensine I, en un octapeptide actif, l'angiotensine II en clivant à l'extrémité carboxy terminale un dipeptide. Elle dégrade également un peptide vasodilatateur, la bradykinine, en peptides inactifs par clivages successifs de deux dipeptides à son extrémité carboxyterminale, ce qui lui vaut son deuxième nom de kininase II.

L'ECA existe sous deux formes, une forme liée à la membrane cellulaire dont la purification nécessite une étape de solubilisation par détergent ou par hydrolyse par la trypsine, et une forme circulante que l'on dénomme soluble. Ces deux formes sont de poids moléculaires très proche et immunologiquement indistinguables par des anticorps polyclonaux anti-ECA.

L'enzyme de conversion endothéliale a été clonée et séquencée. Cette enzyme présente une homologie interne qui permet de distinguer deux domaines correspondant chacun à environ une moitié de la molécule. Chaque domaine comporte une séquence consensus du site actif des enzymes à zinc. L'extrémité C-terminale comporte une région hydrophobe qui peut constituer le peptide d'ancrage de l'enzyme dans la membrane plasmique. Une autre enzyme, l'enzyme de conversion des cellules germinales, a aussi été cloné au laboratoire. Il s'agit d'une enzyme de plus petite taille, présente dans les cellules germinales lors de la puberté. La séquence complète de l'ARN messenger testiculaire de l'enzyme de conversion testiculaire a montré qu'un seul des deux domaines, le domaine carboxyterminal est transcrit. Des études complémentaires ont été réalisées récemment au laboratoire.

a) *Structure et expression du gène de l'ECA*

Parallèlement à l'obtention des séquences des ADNc de l'enzyme endothéliale et testiculaire, nous avons obtenu des clones génomiques correspondant au gène humain de l'ECA. Grâce à plusieurs clones chevauchant, s'étendant sur une région de 30 kb, nous avons déterminé la structure du gène qui s'étend lui-même sur une région de 21 kb. Le gène contient 26 exons. Le transcrit endothélial est codé par les douze premiers exons puis par les exons 14 à 26. L'ARN messenger testiculaire est transcrit à partir de l'exon 13, codant pour la région spécifique de l'ECA germinal, et des exons 14 à 26.

La duplication génique qui était déjà apparente au niveau de la séquence des cDNA par la présence des deux domaines homologues est confirmée au niveau de l'organisation exonique du gène. En effet, les exons codant pour les régions homologues des deux domaines ont des tailles et des phases de lecture conservées. En revanche, les tailles des introns ne sont pas conservées d'un domaine à l'autre. Il est intéressant de remarquer que les 6 premiers exons de la partie 3' sont groupés par paires rapprochées, séparées par de grands introns, ce qui peut évoquer des duplications intragéniques successives, évoquées également par la localisation de résidus cystéine relativement conservée dans la première et troisième paire d'exons. Cette structure par paire n'est pas apparente dans la région 5' du gène, alors que la localisation des résidus cystéine est conservée.

Nous avons voulu savoir si les deux ARN messagers étaient engendrés par un épissage différentiel des deux ARN ou par transcription à partir de deux promoteurs dont l'un serait situé au milieu du gène. Pour répondre à cette

question nous avons pratiqué des expériences de protection contre la ribonucléase des ARN testiculaires et endothéliaux avec des brins d'ARN synthétiques antisenses marqués, issus des régions du gène correspondant aux deux extrémités des ARN précédemment déterminées par clonage de banques restreintes. Nous avons confirmé que les deux extrémités des ARN étaient différentes et qu'il existait deux promoteurs alternes dans le gène : le promoteur de la forme endothéliale flanquant en 5' le site de démarrage de la transcription de l'ARN endothélial et le promoteur testiculaire correspondant à l'intron 12. On peut envisager que d'autres séquences, importantes pour la régulation du gène, soient situées en dehors de ces deux régions. Ces deux promoteurs alternes sont donc à l'origine de la régulation hormonale différente des deux promoteurs. En effet des études in vivo ont montré que l'enzyme testiculaire est sous le contrôle positif des androgènes et, possiblement, des gonadotrophines hypophysaires. Il a été montré, in vitro, sur des cultures de cellules endothéliales que la sécrétion d'enzyme était augmentée par les glucocorticoïdes et par les hormones thyroïdiennes. L'analyse de la séquence nucléotidique des deux promoteurs a montré qu'il existait dans chacun d'eux des motifs consensus de réponse hormonale, dont la fonctionnalité devra être testée in vitro : séquences consensus de réponse aux glucocorticoïdes dans le promoteur endothélial, séquence homologue aux séquences consensus de réponse à l'AMPc dans le promoteur testiculaire (C. Hubert, A.-M. Houot, F. Soubrier).

b) *Contrôle génétique de la concentration d'ECA dans le plasma*

La concentration plasmatique de l'ECA est stable chez un même individu mais varie de façon importante d'un sujet à l'autre. Une étude de ségrégation de la concentration plasmatique de l'enzyme dans des familles nucléaires normales avait montré qu'il existe une agrégation familiale des concentrations d'ECA et que cette ressemblance était d'origine génétique. L'étude de ségrégation démontrait également l'effet d'un allèle sur un gène majeur.

Il était donc particulièrement intéressant de développer des marqueurs génétiques de l'ECA et de rechercher une association entre marqueurs et taux plasmatiques. Nous avons mis en évidence, dans le gène de l'ECA, un polymorphisme à type d'insertion/délétion dont l'informativité était suffisante pour être utilisé dans une étude d'association. Une population normale de 80 sujets a été sélectionnée et une détermination parallèle des taux d'ECA et du génotype a été effectuée. Une association forte a été démontrée entre les formes alléliques du gène et le taux circulant d'ECA. Les valeurs moyennes respectives des taux d'ECA chez les sujets porteurs du génotype homozygote le plus fréquent, le moins fréquent et pour les hétérozygotes sont de 494.1, 392.6, et 299,3 mg/L. Cette étude a donc, à la fois, confirmé l'effet allélique, et d'autre part identifié le gène majeur comme étant celui de l'ECA lui-même. La variance de la concentration sérique de l'ECA expliquée par le

polymorphisme est de 47 % (B. Rigat, C. Hubert, F. Soubrier en collaboration avec F. Alhenc-Gelas et F. Cambien).

c) *Régulation de l'expression du gène de l'ECA in vitro*

On peut diviser ce projet en deux grands volets. Le premier est consacré à l'identification des régions du gène importantes pour la transcription du gène dans chacun des types cellulaires où il s'exprime. Le deuxième volet consiste à étudier les régulations hormonales impliquées dans la transcription du gène.

Identification des régions responsables de la transcription dans différents types cellulaires : comme nous l'avons vu, la forme dite « endothéliale » de l'enzyme est exprimée dans de nombreux types cellulaires. Il est donc intéressant, en première approximation, d'utiliser différentes lignées cellulaires où l'ECA s'exprime et d'analyser, par transfection *in vitro*, le rôle des différentes régions du promoteur de l'ECA dans la transcription du gène. Celles-ci sont clonées dans un vecteur d'expression en amont d'un gène reporter (CAT) et le vecteur est introduit dans les cellules. Après réalisation de délétions progressives de ce promoteur et mesure de l'efficacité respective de chaque construction, on verra si ce sont les mêmes régions qui assurent la transcription dans les cellules de type intestinal (lignée KAKO 2), de type tubulaire rénal (lignée MDCK), et dans les cellules endothéliales immortalisée de lapin (collaboration avec Mme Denise Paulin, Institut Pasteur), où nous disposons de résultats (P. Testut, C. Hubert).

En ce qui concerne le promoteur de la forme germinale, la difficulté est de trouver le modèle cellulaire adéquat. La transfection de cellules de tétarocarcinome humain (lignée Tera-1) par différentes constructions de gènes hybrides, contenant le gène CAT sous contrôle du promoteur germinale n'a pas donné de résultats suffisamment convaincants pour être poursuivie. Nous nous sommes tournés vers l'utilisation de cellules immortalisées de souris, obtenue par Mme Mino Rassoulzadegan à Nice, en réalisant des souris transgéniques avec le virus du polyome. Ces cellules ont les caractéristiques de cellules germinales et les résultats préliminaires semblent montrer l'expression de l'ECA germinale dans ces cellules. L'étude du promoteur se fera en réalisant des transfections puis des extraits nucléaires de ces cellules (S. Nadaud, F. Soubrier).

d) *Contrôle génétique de l'ECA plasmatique*

Nos premiers résultats ont montré que le niveau d'ECA plasmatique était largement lié à l'effet d'un allèle qui était en déséquilibre de liaison avec les marqueurs génétiques dont nous disposons. Notre recherche dans ce domaine va s'effectuer dans plusieurs directions.

L'étude que nous avons achevée portait sur des sujets non apparentés, d'âge adulte et également répartis dans les deux sexes. Nous analysons actuellement les résultats d'une étude portant sur des familles nucléaires normales, dont les parents sont d'âge adulte et les enfants entre 12 et 18 ans. Cette étude familiale nous permettra de comparer les résultats de l'analyse de ségrégation des taux et l'analyse selon le marqueur génotypique. D'ores et déjà cette comparaison nous montre que la totalité de l'effet du gène majeur déduit de l'analyse de ségrégation n'est pas expliqué par le polymorphisme. Ceci montre que le polymorphisme identifié n'est qu'un marqueur et que l'insertion en elle-même ne joue pas de rôle sur l'expression. L'identification d'autres marqueurs génotypiques est également nécessaire pour définir un haplotype qui soit en complet déséquilibre de liaison avec la mutation responsable.

2 - Contrôle génétique de la pression artérielle

La variance d'origine génétique de la pression artérielle, bien mise en évidence par les études biométriques, représenterait environ 30 % de la variance totale de la pression artérielle (PA). Même si plusieurs mécanismes de régulation de la PA sont bien connus, les gènes impliqués dans la physiopathologie de l'hypertension artérielle ne sont pas identifiés. On peut admettre que la variance de la PA est due à des polymorphismes de séquence des gènes impliqués dans la régulation de la PA. Les polymorphismes fonctionnels, qui sont responsables des variations de la PA ne sont pas directement identifiables mais ils peuvent être en déséquilibre de liaison, du fait de leur proximité sur le gène, avec des marqueurs génétiques facilement détectables si l'on dispose de sondes moléculaires pour ces gènes. Notre travail de biologie moléculaire portant sur les gènes du système rénine-angiotensine nous a permis de disposer de marqueurs génétiques sur ces gènes, que l'on dit candidats à une responsabilité dans le développement de l'HTA.

Étude du gène de la rénine dans l'hypertension artérielle essentielle : Deux études ont été successivement réalisées.

a) *Étude d'association : comparaison d'une population hypertendue et normotendue*

La première étude est une étude d'association qui nous a permis de comparer une population hypertendue, de plus de 100 sujets à une population contrôle, appariée pour l'âge et le sexe. Dans les deux populations nous avons cherché à éviter les facteurs de confusion que sont l'obésité, le diabète ou l'intoxication éthylique. Nous avons déterminé les polymorphismes du gène rénine dans ces deux populations. Il s'agit de trois polymorphismes de sites de restriction (*Hind* III, *Taq* I, *Hinf* I) dont l'informativité est faible s'ils sont étudiés isolément mais leur étude de façon combinée dans des haplotypes

permet d'atteindre un degré d'hétérozygoté convenable pour une telle étude. Les fréquences alléliques déterminées dans les deux populations sont identiques, de même que les fréquences haplotypiques. Il n'y a pas de déséquilibre de liaison mis en évidence entre les polymorphismes étudiés du gène rénine et le locus responsable de l'HTA dans cette série de patients. Ces résultats ne nous permettent donc pas d'impliquer le gène rénine dans l'hypertension essentielle et sont en accord avec les résultats obtenus par une autre équipe sur une grande famille à forte prévalence d'HTA (F. Soubrier, X. Jeunemaitre, B. Rigat, A.-M. Houot).

b) *Etude de couples de germains hypertendus*

Nous avons pratiqué une deuxième étude qui portait sur une autre population d'hypertendus. Il s'agit de couples de germains affectés par l'HTA. Cette approche est tout à fait différente de l'étude cas-témoins que nous venons de décrire. La méthodologie statistique utilisée consiste à rechercher une différence significative entre l'identité observée entre les germains pour les marqueurs étudiés et l'identité attendue pour ces marqueurs, dans l'hypothèse d'une ségrégation indépendante des marqueurs et de la maladie. Le calcul de l'identité attendue tient compte de nombreux paramètres, dont la fréquence des allèles étudiés. Dans le cas de la rénine, nous n'avons pas mis en évidence de différence significative entre l'identité observée et l'identité attendue. Il n'y a donc pas de coségrégation apparente des marqueurs et de la maladie (X. Jeunemaitre, B. Rigat, A.-M. Houot, F. Soubrier).

II. ÉTUDE DES RAPPORTS STRUCTURES/FONCTIONS DES PROTÉINES DU SYSTÈME RÉNINE-ANGIOTENSINE ET DES RÉCEPTEURS MEMBRANAIRES

Equipe E. CLAUSER, C. AUZAN, I. LECONTE, C. MONNOT, C. BIHOREAU,
B. TEUTSCH

L'activité scientifique du groupe au cours de l'année 1990-1991 a porté sur l'étude des rapports structure fonction de protéines du système rénine-angiotensine et de récepteurs membranaires. Ces études ont utilisé des techniques de biologie moléculaire (clonage, mutagenèse dirigée, construction de protéines chimères), de biologie cellulaire (expression de protéines recombinantes), de biochimie et de physiologie.

a) *Enzyme de conversion de l'angiotensine*

L'enzyme de conversion de l'angiotensine I a été étudié sous deux aspects, grâce à l'obtention d'un ADNc complet codant pour cet enzyme.

1) Un enzyme muté ne comportant plus son segment hydrophobe C terminal a été comparé immunologiquement et enzymatiquement à l'enzyme recom-

binant intact membranaire ou sécrété. Ceci a permis de conclure à l'intégrité fonctionnelle de ces enzymes recombinants et que le mécanisme de sécrétion de l'enzyme passait par une protéolyse C terminale.

2) La fonction enzymatique des deux domaines catalytiques a été étudiée par expression isolée de chacun des deux domaines et production d'enzymes mutés sur des résidus essentiels de l'un ou l'autre de ces sites. Cette étude a montré l'activité enzymatique des deux domaines, qui sont capables d'hydrolyser les substrats, tels l'HHL ou l'angiotensine I avec la même constante d'affinité mais avec une constante catalytique différente. Le domaine N terminal catalytiquement moins actif, présente une sensibilité au chlore différente du domaine C terminal. (L. Wei, E. Clauser, en collaboration avec F. Alhenc-Gelas).

b) *Mas related gene (Mrg) et récepteur de l'angiotensine II*

Les études sur le récepteur de l'angiotensine II ont porté sur l'identification et la caractérisation d'une protéine codée par un gène proche de l'oncogène *mas*, qui avait été décrit comme relié fonctionnellement et structuralement à ce récepteur. Ce gène, appelé *Mrg*, a été séquencé et exprimé de façon stable ou transitoire dans des cellules CHO, COS et dans des œufs de Xénope. De cette étude il ressort que la protéine *Mrg* n'est pas un récepteur de l'angiotensine puisque son expression ne modifie pas le nombre de sites de liaison de l'angiotensine II à la surface des cellules CHO ou COS. Cependant son expression dans les œufs de Xénope augmente de façon considérable la réponse à l'angiotensine II. Les caractéristiques pharmacologiques de cette réponse laissent penser que la protéine *Mrg* interfère dans les voies de signalisation du récepteur endogène de l'angiotensine II et potentialise ainsi la réponse à l'angiotensine II par un mécanisme qui reste à investiger.

Le récepteur de l'angiotensine II a été cloné depuis par deux groupes américains, qui ont démontré l'absence d'analogie importante de ce récepteur avec les protéines de la famille de l'oncogène *mas*. L'obtention d'un clone codant pour le récepteur de rat, nous a permis d'entreprendre un vaste programme d'étude des domaines fonctionnels de ce récepteur. Nos premiers efforts se sont concentrés sur la recherche des séquences impliquées dans la liaison de l'angiotensine II et de ses antagonistes peptidiques ou non peptidiques (C. Monnot, C. Bihoreau, B. teutsch, V. Weber, E. Clauser).

c) *Récepteur de l'insuline*

Au cours de l'année écoulée, nos travaux sur le récepteur de l'insuline se sont poursuivis. Cette glycoprotéine membranaire formée de deux chaînes, dont l'une lie l'insuline et l'autre possède une activité tyrosine-kinase a été étudiée dans deux de ses aspects.

1) Le rôle de la structure bicaténaire a été investigué par la production de mutants possédant une séquence modifiée du site de clivage, formée de 4 acides aminés basiques. Ces mutations conduisent à la production de récepteurs monocaténaires, exprimés à la membrane cellulaire et capables de s'activer sous l'effet de l'insuline et de transmettre les différents messages responsables des actions intracellulaires de l'hormone. Ceci exclut donc qu'un rôle majeur de cette structure bicaténaire intervienne dans le fonctionnement du récepteur.

2) Le rôle des structures oligosaccharidiques liées au asparagine de la chaîne b dans la transmission du message entre les deux chaînes a été étudié par mutation des 4 sites potentiels de N glycosylation sur cette chaîne. Un tel mutant est exprimé à la surface de la cellule, mais présente une chaîne b de poids moléculaire réduit (80 kDa au lieu de 95 kDa). Ce récepteur muté lie normalement l'insuline, mais sa tyrosine kinase est peu ou pas stimulée par cette liaison. Les conséquences de cette absence de couplage entre les deux chaînes sont une absence de transmission des effets métaboliques et mitogéniques de l'insuline par l'intermédiaire de ce récepteur. Ces travaux font l'objet de deux articles en cours de rédaction (I. Leconte, C. Auzan, E. Clausser).

III. *BIOCHIMIE STRUCTURALE DE L'ENZYME DE CONVERSION DE L'ANGIOTENSINE (ECA)*

Equipe M.T. CHAUVET, A. MICHAUD

Le premier objectif de ce groupe de travail est de comparer les extrémités N-terminales et C-terminales des diverses formes moléculaires de l'enzyme de conversion de l'angiotensine I isolées dans le laboratoire : a) Une forme ancrée dans la membrane par une pièce hydrophobe de 17 acides aminés localisée dans la partie C-terminale de cette glycoprotéine d'environ 170 Kd., isolée soit des cellules du cortex rénal ou du poumon humain soit produite par les cellules CHO transfectées par le cDNA correspondant à la forme membranaire des cellules endothéliales vasculaires humaines ; b) Une forme soluble isolée du plasma humain ou du milieu de culture de CHO transfectées par le cDNA correspondant à la forme membranaire.

Le deuxième objectif est de déterminer la nature de l'apparition des formes solubles. Nous voulons essayer de caractériser puis d'isoler l'enzyme responsable de la libération de l'ECA de la membrane des CHO transfectées et voir si ce mécanisme est applicable à la forme circulante plasmatique.

Nous avons dû améliorer les techniques de purification de ces protéines et mettre au point différentes techniques d'analyse des protéines qui n'existaient pas dans le laboratoire. Les techniques mises au point récemment sont :

a) *Isolement des diverses formes d'ECA*

L'amélioration majeure provient d'une meilleure fixation sur le gel d'affinité, surtout pour la forme plasmatique, par utilisation d'un sépharose dont nous avons modifié le bras (28 Å au lieu de 14 Å) pour le couplage de l'inhibiteur, lisinopril. Pour l'obtention des formes recombinantes, nous avons mis au point une culture intensive des CHO recombinantes.

b) *Détermination de l'extrémité N-terminale des protéines*

Nous avons mis au point une méthode manuelle originale, suivant la technique d'Edman, sur des quantités de protéines inférieures à 300 picomoles, où la protéine est fixée de façon covalente sur une membrane d'immobilon P.

c) *Détermination de l'extrémité C-terminale de protéines*

Nous avons préalablement introduit une méthode d'identification micro-quantitative des acides aminés en utilisant une séparation en phase reverse HPLC, avec prédérivation des aminoacides par le phénylisothiocyanate. Nous avons développé deux approches pour l'identification de l'extrémité C-terminale : a) action des carboxypeptidases Y et P, sur des quantités de 250 picomoles de protéine par cinétique ; b) identification du peptide tryptique C-terminal par isolement sur gel d'anhydrotrypsine agarose, purification par HPLC et reconnaissance par sa composition quantitative en acides aminés effectuée après hydrolyse acide de ce peptide.

Les résultats préliminaires sont les suivants :

a) Les 14 premiers résidus d'acides aminés de l'enchaînement N-terminal sont identiques pour la forme membranaire et circulante de l'enzyme et un site de glycosylation effectif a été localisé en position 9 de la séquence de l'ECA plasmatique ;

b) L'ECA membranaire a une extrémité C-terminale qui correspond à la totalité de celle déduite de la séquence du c-DNA ;

c) Nous recherchons la localisation de l'enzyme responsable de la formation de la forme sécrétée de l'ECA chez les CHO, en soumettant *in vitro* de l'ECA rénale à l'action de diverses fractions de cellules CHO sauvages, cultivées sans sérum de veau fœtal. L'enzyme ne semble pas être sécrétée dans le milieu de culture et pour l'instant seules les fractions cytosoliques ont scindé l'ECA membranaire au niveau de la pièce hydrophobe (M.-T. Chauvet, A. Michaud).

IV. RÉGULATION DE L'EXPRESSION DE LA RÉNINE

Equipe F. PINET, P. BORENSTEIN, M.-H. DONNADIEU, J. PHILIPPE,
R. DELLA BRUNA

a) *Isolement et caractérisation des cellules chorioniques en culture*

Notre hypothèse de travail était de montrer que les cellules chorioniques étaient un bon modèle de remplacement des cellules juxtaglomérulaires pour étudier la région 5' régulatrice du gène de la rénine.

La mise au point d'un milieu défini pour les cellules chorioniques nous a permis d'étudier l'effet de différents modulateurs sur la sécrétion de rénine. Nous nous sommes plus particulièrement intéressés au rôle de l'angiotensine II qui est inhibiteur. Des études de Scatchard ont permis de mettre en évidence la présence d'un récepteur spécifique à l'angiotensine II avec un Kd de l'ordre de $0,1 \cdot 10^{-9}$ M. En collaboration avec Armin Kurtz, en utilisant le fura-2 sur une cellule chorionique unique, nous avons pu montrer que l'angiotensine II (10 nM à 10 μ M) mobilisait le calcium dans les cellules chorioniques très rapidement, supposant que la cellule répondait par une utilisation des stocks intracellulaires de calcium. Le comportement des cellules chorioniques sur la régulation de la sécrétion de rénine étant similaire à celui des cellules juxtaglomérulaires, nous avons pu envisager l'étude de la région régulatrice du gène de la rénine ; L'utilisation de constructions associant la région 5' du gène de la rénine et le gène CAT ayant montré une faible expression transitoire, nous avons effectué d'autres constructions associant le gène de la rénine en utilisant la luciférase comme gène reporteur. Une sensibilité dix fois supérieure à été obtenue avec le système luciférase par rapport au système CAT.

A l'heure actuelle, trois constructions associant le gène de la rénine (3 000, 1 000 et 600 paires de bases) et le gène de la luciférase ont pu être testées sur les cellules chorioniques dont les conditions optimum de transfection ont été déterminées. Les premiers résultats obtenus nous permettent de supposer la présence d'un « silencer » dans la région comprise entre - 3 000 et - 1 000 paires de bases et la présence d'un « enhancer » dans la région comprise entre - 1 000 et - 600 paires de bases.

Nous localiserons, les séquences importantes, intervenant dans l'expression du gène de la rénine, en utilisant des constructions où le gène de la rénine est plus ou moins délété en 5' (P. Borenstein, M.-H. Donnadiéu, J. Philippe, F. Pinet).

b) *Etude du système rénine-angiotensine surrénalien chez l'homme*

La présence du système rénine-angiotensine a été démontré dans les glandes surrénales chez le rat mais n'a pas été étudiée en détail chez l'homme.

Les différents composés du système rénine-angiotensine (rénine, prorénine, angiotensinogène et angiotensine II) et les RNA messagers de la rénine et de l'angiotensinogène ont été étudiés dans la surrénale normale et tumorale. Les tumeurs sont des adénomes de Conn (hyperaldostéronisme primaire), des phéochromocytomes, des incidentalomes (tumeurs non sécrétantes) et des adénomes ou des corticosurrénales sécrétant du cortisol (Cushing).

La démonstration, pour la première fois, de l'expression et de la présence du système rénine-angiotensine dans les mêmes tissus surrénaux suggère l'idée d'une production locale d'angiotensine indépendante du système rénine-angiotensine circulant (K. Racz, J.-M. Gasc).

c) Etude de la sécrétion et de la synthèse de rénine dans les cultures de cellules juxtaglomérulaires de souris

En collaboration avec l'équipe d'Armin Kurtz à Zurich, nous avons caractérisé la synthèse et la sécrétion de rénine en culture primaire de cellules juxtaglomérulaires isolées à partir de rein de souris. L'étude des médiateurs intervenant dans la synthèse de rénine se poursuit avec la mise au point de la quantification des ARN messagers par PCR dans le but d'étudier la régulation de la transcription dans ces cultures. Nous étudions le moyen d'extraire les ARN en une étape à partir des cellules pour utiliser directement la PCR sur l'extrait. La mise au point de la concentration de magnésium (7,5 mM) et du nombre de cycles ($n = 20$) nous a permis d'avoir une PCR « quantifiable ». A l'heure actuelle, en gel d'agarose 2 %, nous pouvons détecter les produits amplifiés de manière quantitative à partir de 2 μg jusqu'à 32 ng d'ARN (R. Della Bruna).

d) Culture de cellules juxtaglomérulaires humaines transfectées

Indépendamment du modèle de cellules chorioniques sécrétant de la rénine sous forme de prorénine, nous souhaitons améliorer nos systèmes de culture de cellules productrices de rénine et avoir notamment une lignée de cellules juxtaglomérulaires permanente et sécrétant la rénine sous forme active. Les cellules isolées à partir d'une tumeur humaine vont être transfectées avec un vecteur thermosensible associant le promoteur de la vimentine et l'antigène T de SV40. Des études réalisées par P. Vicart (Institut Pasteur) ont montré qu'un tel vecteur permettait l'immortalisation de différents types de cellules humaines (F. Pinet, en collaboration avec P. Vicart et D. Paulin).

V. ÉTUDE MORPHOLOGIQUE (IMMUNOHISTOLOGIE ET HYBRIDATION IN SITU) ET ULTRASTRUCTURALE DES DEUX PRINCIPALES ENZYMES DE MATURATION DE L'ANGIOTENSINE II : RÉNINE ET ENZYME DE CONVERSION DE L'ANGIOTENSINE I (ECA)

Equipe J.-M. GASC, M. SIBONY, F. MONGIAT, M.-T. MORIN

a) *Rénine*

La rénine existe dans les cellules sous au moins deux formes : la rénine active et un précurseur inactif : la prorénine. La maturation de la prorénine en rénine s'effectue dans la cellule par coupure enzymatique du prosegment. Un immunomarquage à l'or colloïdal, observé au microscope électronique, montre que la rénine est stockée dans de grosses vésicules dans les myocytes des appareils juxtaglomérulaires de rat. Un double immunomarquage pour révéler simultanément la rénine et la prorénine avec des particules d'or colloïdal de tailles différentes montre que la prorénine est révélée majoritairement dans le cytoplasme et dans quelques rares petites vésicules distinctes, mais au voisinage, des grosses vésicules à rénine. Celles-ci ne contiennent que peu de prorénine. Il semble donc que la prorénine est soit sécrétée directement sans passer par les vésicules de stockage de la rénine, soit maturée lorsque les petites vésicules atteignent une certaine dimension par accroissement ou par fusion. Il faut remarquer que l'absence d'immunomarquage spécifique de rénine active dans les petites vésicules riches en prorénine, (dont la molécule comprend toute la séquence peptidique de la rénine active), indique que l'épitope reconnu par notre anticorps anti-rénine active est masqué par le prosegment. Cela confirme que le prosegment inactive la prorénine en masquant et bloquant une partie de la molécule dont la libre accessibilité est indispensable à l'activité enzymatique de la rénine.

L'épitope reconnu par l'anticorps anti-rénine active avait été identifié comme étant une boucle peptidique impliquée dans l'activité enzymatique de la rénine. Nous avons montré que cette partie de la molécule de rénine est très largement conservée entre les espèces animales puisque cet anticorps reconnaît sur coupe histologique la rénine humaine, du marmoset, de lapin, de cobaye, de rat, de poulet et probablement aussi celle du xénopus. Le degré d'homologie de la rénine de ces différentes espèces est pourtant assez limité puisque d'autres anticorps antirénine ne croisent pas, ou peu, entre les espèces. De plus, la sonde de RNA complémentaire du mRNA de la rénine humaine ne donne un signal en hybridation *in situ* sur le rein que chez le marmoset et, très faiblement, chez le lapin. Les mêmes sondes moléculaires (anticorps et cRNA) ont été utilisées pour la détection de la rénine dans des tumeurs surrenaliennes humaines, les phéochromocytomes (J.-M. Gasc, F. Mongiat, M.-T. Morin).

b) *Enzyme de conversion de l'angiotensine*

Cette enzyme possède une particularité tissulaire remarquable : la forme dite somatique, présente dans divers épithélium et endothélium, est une forme longue (160-170 kDa) comprenant deux sites enzymatiques, et la forme dite germinale, retrouvée dans les spermatides et les spermatozoïdes, est une forme courte (90-100 kDa) comprenant un seul site enzymatique. Chacune de ces formes comporte une séquence N-terminale spécifique.

A l'aide d'anticorps dirigés contre les parties centrale ou C-terminale communes aux deux formes, ou contre les parties N-terminales spécifiques à chacune d'elles, nous avons étudié la distribution tissulaire et cellulaire des deux formes de l'ECA. Grâce aux anticorps spécifiques des deux formes, il a été montré qu'elles sont localisées respectivement dans les tissus somatiques ou les formes mûres des spermatides. Ces observations constituent une confirmation de l'absence de forme courte dans les tissus somatiques, et la première preuve directe de l'absence de la forme longue, somatique, dans les cellules germinales.

Ces résultats ont été confirmés par hybridation in situ avec une sonde reconnaissant les ARNm des ECA somatique et germinale et une sonde spécifique du segment N-terminal testiculaire. Alors que la sonde commune produit un signal d'hybridation dans les tissus somatiques et germinaux, la sonde spécifique germinale n'est positive que dans les spermatides mûrs.

Il existe donc bien une stricte spécificité tissulaire des sites d'initiation de la transcription du gène de l'ECA, produisant les formes somatiques d'une part, et germinale d'autre part.

Parmi les tissus somatiques exprimant l'ECA, on trouve les épithéliums du jéjunum, de l'épididyme, du tubule proximal du rein et les endothélium vasculaires en particulier dans le poumon. Le tubule proximal du rein présente une particularité : bien que l'enzyme soit très abondante dans ces cellules, les RNA messagers n'y sont pas détectables. Il ne s'agit probablement pas d'un cas de réabsorption de la protéine, mais plus vraisemblablement d'un problème de stabilité des mRNA de l'ECA dans le rein (M. Sibony, J.-M. Gasc).

BIBLIOGRAPHIE

1990

GAILLARD-SANCHEZ I., BRUNEVAL P., CLAUSER E., BELAIR M.F., DA SILVA J.L., BARIETY J., CAMILLERI J.P. and CORVOL P. Successful detection by in situ cDNA hybridization of three members of the serpin family : angiotensinogen, α 1-protease inhibitor and antithrombin III in human hepatocyte. *Modern Pathol.* 3 : 216-222,1990.

GARDES J., BAUSSANT T., CORVOL P., MENARD J. and ALHENC-GELAS F. Effect of bradykinin and kininogens in the angiotensin II vasoconstricted isolated perfused rat kidney. *Am. J. Physiol.* 258 : F1213-F1281, 1990.

CORVOL P., CHAUVEAU D., JEUNEMAITRE X. and MENARD J. Human renin inhibitor peptides. *Hypertension* 16 : 1-11,1990.

KIM J.K., SOUBRIER F., MICHEL J.B., BANKIR L., CORVOL P. and SCHRIER R.W. AVP gene regulation in the homozygous Brattleboro rat. *J. Clin. Invest.* 86 : 17-24,1990.

MICHEL J.B., SAYAH S., GUETTIER C., NUSSBERGER J., PHILIPPE M., GONZALEZ M.F., CARELLI C., GALEN F.X., MENARD J. and CORVOL P. Physiological and immunopathological consequences of active immunization of spontaneously hypertensive and normotensive rats against murine renin. *Circulation* 81 : 1899-1910, 1990.

JULIEN J., DUFLOUX M.A., PRASQUIER G., CHATELLIER G., MENARD D., PLOUIN P.F., MENARD J. and CORVOL P. Effects of captopril and minoxidil on left ventricular hypertrophy in resistant hypertensive patients : a six month double-blind comparison. *J. Am. Coll. Cardiol.* 16 : 137-142,1990.

GANDRILLE S., AIACH M., LANE D., VIDAUD D., MOLHO-SABATIER P., CASO R., MOERLOSE P., FIESSINGER J.N. and CLAUSER E. Important role of Arg 129 in heparin binding site of antithrombin III : Identification of a novel mutation Arg 129 to Gln. *J. Biol. Chem.* 265 : 18997-19001,1990.

MICHEL J.B., MERCADIER J.J., GALEN F.X., URBAIN R., DUSSAULE J.C., PHILIPPE M., and CORVOL P. Urinary cyclic GMP as an indicator of experimental congestive heart failure in rats. *Cardiovasc. Res.* 24 : 946-952,1990.

KIM J.K., MICHEL J.B., SOUBRIER F., DURR J., CORVOL P. and SCHRIER R.W. Arginin-vasopressin gene expression in chronic cardiac failure in rats. *Kidney Int.* 38 : 818-822,1990.

SOUBRIER F., JEUNEMAITRE X., RIGAT B., HOUOT A.M., CAMBIEN F. and CORVOL P. Similar frequencies of renin gene RFLPs in hypertensives and normotensives. *Hypertension* 16 : 712-717,1990.

RIGAT B., HUBERT C., ALHENC-GELAS F., CAMBIEN F., CORVOL P. and SOUBRIER F. An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. *J. Clin. Invest.* 86 : 1343-1346,1990.

CHERQUI G., REYNET C., CARON M., MELIN B., WICEK D., CLAUSER E., CAPEAU J. and PICARD J. Insulin receptor tyrosine residues 1162 and 1163 control insulin stimulation of myristol-diacylglycerol generation and subsequent activation of glucose transport. *J. Biol. Chem.* 265 : 21254-21261,1990.

1991

WEI L., ALHENC-GELAS F., SOUBRIER F., MICHAUD A., CORVOL P. and CLAUSER E. Expression and characterization of recombinant human angiotensin I-converting enzyme. *J. Biol. Chem.* 266 : 5540-5546,1991.

PLOUIN P.F., CUDEK P., ARNAL J.F., GUYENE T.T. and CORVOL P. Immunoradiometric assay of active renin versus determination of plasma renin activity in the clinical investigation of hypertension, congestive heart failure and liver cirrhosis. *Hormone Res.* 34 : 138-141,1991.

ARNAL J.F., CUDEK P., PLOUIN P.F., GUYENE T.T., MICHEL J.B. and CORVOL P. Low angiotensinogen levels are related to the severity of liver dysfunction in congestive heart failure : implications for renin measurement. *Am. J. Med.* 90 : 17-22,1991.

DELLA BRUNA R., PINET F., CORVOL P. and KURTZ A. Regulation of renin secretion and renin synthesis by second messengers in isolated mouse juxtaglomerular cells. *Cell. Physiol. Biochem.* 1 : 98-102,1991.

DARBY I., BOUHNİK J., COEZY E. and CORVOL P. Thyroid hormone receptors and stimulation of angiotensinogen production in HepG2 cells. *In Vitro* 27 : 21-24,1991.

EXPOSÉS, CONGRÈS

Monsieur Pierre Corvol a été le chairman d'une session de la Gordon Conference on Angiotensin II (Oxnard, USA, 18-22.02.91). Il a donné une conférence au Département de Médecine Interne et de Recherche Clinique de Bâle (8.01.91). Il a donné une série de conférences aux Etats-Unis à la Mayo Clinic (P^r Romero), au Hypertension Center (P^r O. Carretero), et à la Cleveland Clinic (C. Ferrario, M. Bumpus) du 8 au 13 avril 1991. Il a donné une conférence à Edinbourg au Congrès sur la Génétique des Maladies Chroniques, le 14 juin 1991.

Le laboratoire de Médecine Expérimentale a organisé un meeting qui s'est tenu à Paris sur l'utilisation des rats transgéniques dans l'hypertension artérielle et les maladies cardiovasculaires (Programme Européen : Transgeneur Meeting - 26 avril 1991).

Monsieur Eric Clauser a participé aux colloques et symposium suivants : Récepteur de l'insuline - Colloque INSERM « Récepteurs et signalisation intracellulaire » - Nice, 7-9 mars 1991 ; Cloning and characterization of a new mas related gene - BI Lecture - Heidelberg University - Germany - June 1991 ; Genetic diagnosis of qualitative and quantitative antithrombin III deficiencies - 7^e Congrès Français d'Hématologie - Lyon - Juin 1991.

Monsieur Florent Soubrier a participé aux colloques et symposium suivants : WHO/IPSEN Foundation joint Meeting - Moscou - Décembre 1990 (invité) ; Minicolloque INSERM - Génétique et épidémiologie - Angers 13-15 mars 1991 (invité) ; Symposium on ACE Inhibition II - 21 février 1991 (invité) ; Société Européenne de Néphropathie Diabétique - Angers 10 mai 1991 (invité) ; Conférence Jacques Monod sur les Ectopeptidases Membranaires - Aussois - 27-31 mai 1991 (invité).

ENSEIGNEMENT

Monsieur Florent Soubrier a participé aux enseignements suivants : DEA d'Endocrinologie Moléculaire — Paris XI ; C2 de Physiologie - Paris VI (Faculté de Médecine Tenon) ; DES de Néphrologie - Université Paris VI.

Monsieur Eric Clauser a participé aux enseignements suivants : DEA de Biochimie (R. Ascher) ; DEA d'Endocrinologie Moléculaire et Cellulaire (E. Milgrom) ; Certificat C2 de Pharmacologie Endocrinienne ; Maîtrise de Biochimie - Université Paris-Sud (Pharmacie) ; DEA Structure et Fonctionnement des Systèmes Biologiques Intégrés (B. Rossignol - Paris XI) ; DEA de Pharmacologie (Option dirigée par J. Hanoune).

LISTE DES DIPLÔMÉS

1990-1991

DEA

Patrice TESTUT - DEA d'Endocrinologie Moléculaire (Paris XI).
Olivier PLESKOFF - DEA de Biologie Cellulaire et Moléculaire (Paris VI).
Catherine MONNOT - DEA de Biologie Cellulaire et Moléculaire (Paris VI).

Thèses

Brigitte RIGAT - Thèse de Doctorat de l'Université de Paris-Sud (Mention Sciences Pharmaceutiques) : « *Utilisation de génotypes marqueurs pour l'étude du système rénine-angiotensine dans l'hypertension artérielle essentielle humaine* ».

Florent SOUBRIER - Thèse de Doctorat de l'Université Paris VI (Spécialité Biochimie) : « *Structure et expression des gènes des enzymes de maturation du système rénine-angiotensine* ».