

## Médecine expérimentale

M. Pierre CORVOL, professeur

Le cours de Médecine Expérimentale a porté sur les récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G. Un accent particulier a été mis sur le récepteur de l'angiotensine II et ses mécanismes de transduction du signal. Le modèle général du mécanisme d'action des récepteurs membranaires implique que l'information perçue par le récepteur au niveau de la membrane plasmique cellulaire soit transmise à un effecteur biologique, habituellement par l'intermédiaire d'un élément de couplage. Les récepteurs à sept domaines transmembranaires, couplés aux protéines G, représentent probablement la catégorie la plus conservée et la plus diversifiée de l'ensemble des récepteurs membranaires. Le transfert de l'information du milieu extracellulaire à la cellule fait intervenir trois protéines membranaires : le récepteur, une protéine G (qui fixe et hydrolyse le GTP au cours de son cycle de fonctionnement), un effecteur qui régule le taux intracellulaire d'ions ou de seconds messagers. Les messages qu'ils perçoivent sont variés : émissions lumineuses, molécules odorantes, hormones peptidiques, neurotransmetteurs et protéines. Leur structure comporte une partie N-terminale extracellulaire, sept hélices  $\alpha$  transmembranaires et une partie C-terminale intracellulaire. Ils sont couplés à une protéine G qui est mise en jeu lors de l'activation du récepteur par son ligand. La protéine G ainsi activée échange une molécule de GDP pour une molécule de GTP et agit à son tour sur un effecteur. L'effecteur est une enzyme (adénylate cyclase, phospholipase C, ...) ou un canal ionique (canal  $K^+$ ,  $Ca^{++}$ , ...). La reconnaissance du message dont la spécificité est assurée par le récepteur membranaire aboutit ainsi, après un phénomène d'amplification dû à la mise en jeu de plusieurs cycles catalytiques des protéines G et de l'effecteur, à des événements cellulaires : modification de la transcription génique, croissance cellulaire, communication intercellulaire, modulation du potentiel membranaire.

### *Caractéristiques structurales des récepteurs à sept domaines transmembranaires*

Les récepteurs à sept domaines transmembranaires ont en commun un certain nombre de caractéristiques structurales : ils ne possèdent pas de

peptide signal, ils ont une chaîne polypeptidique unique d'environ 400 à 600 acides aminés, leur partie N-terminale est glycosylée, leur partie C-terminale comporte des sites de phosphorylation et, le cas échéant, de palmitoylation. Il existe des homologies importantes de structure primaire de ces récepteurs à l'intérieur des sous-familles telles que celles des récepteurs  $\alpha$ -, et  $\beta$ -adrénergiques, des récepteurs à la sérotonine ou à la dopamine. Ces ressemblances ont été mises à profit pour cloner par analogie divers sous-types de récepteurs appartenant à une même famille. Par contre, il n'existe que peu d'homologie entre les différentes familles entre elles, en dehors de l'organisation canonique des sept hélices  $\alpha$  transmembranaires. L'organisation génique de ces récepteurs est relativement simple : la plupart de ces récepteurs ne possèdent pas ou peu d'introns. Un certain nombre d'entre eux subissent un épissage différentiel aboutissant à la génération de sous-types de récepteurs, par exemple dans le cas du récepteur D2 de la dopamine.

La structure tridimensionnelle d'un récepteur à sept domaines transmembranaires, la bactériorhodopsine, est connue grâce aux reconstructions d'images obtenues par cryomicroscopie électronique à haute résolution. Les sept hélices transmembranaires sont rassemblées sous la forme d'un faisceau et participent pour cinq d'entre elles à la liaison du rétinol, le ligand de la rhodopsine. L'activation photonique de la bactériorhodopsine provoque la formation d'une base de Schiff au niveau du rétinol et aboutit à l'expulsion d'un proton du milieu intracellulaire vers le milieu extracellulaire. Les coordonnées tridimensionnelles de la bactériorhodopsine ont été utilisées pour construire des modèles d'autres récepteurs à sept domaines transmembranaires, notamment des opsines de mammifères dont la structure primaire est relativement proche de la bactériorhodopsine. La rhodopsine, protéine à sept domaines transmembranaires présente dans les cellules à bâtonnets, impliquées dans la vision nocturne, et les iodopsines responsables de la vision des couleurs rouge, bleu et vert, ont des structures voisines. Les dyschromatopsies, telles que le daltonisme, sont liées à des anomalies structurales de leurs gènes (délétions, crossing-over). Les rétinites pigmentaires, maladies autosomiques dominantes pouvant aboutir à une dégénérescence rétinienne secondaire à la destruction des photorécepteurs, sont en partie expliquées par différents types de mutations ponctuelles sur le gène codant pour la rhodopsine ou les iodopsines. Elles aboutissent à des récepteurs incapables d'être excités par les photons ou incomplètement maturés. Jusqu'à présent, il n'existe pas d'autres mutations connues des récepteurs à sept domaines transmembranaires responsables d'une pathologie humaine.

### *Protéines G*

Les protéines G, auxquelles sont couplés les récepteurs à sept domaines transmembranaires, sont des hétérotrimères de sous-unités  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ . Il existe une grande diversité des protéines G puisqu'il existe plus d'une ving-

taine de sous-unités  $\alpha$  et plus de 4 sous-unités  $\beta$  et  $\gamma$ . Certaines sous-unités  $\alpha$  peuvent stimuler l'adénylate cyclase ( $\alpha_s$ ) ou l'inhiber ( $\alpha_i$ ), stimuler la phospholipase C ( $\alpha_q$ ), etc. Les protéines G peuvent aussi stimuler directement différents canaux ( $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{K}^+$ , ...). Une grande diversité des mécanismes de transduction du message est possible car un récepteur peut activer plusieurs protéines G différentes, une protéine G peut réguler plusieurs effecteurs, et enfin un effecteur peut être régulé par différentes protéines G.

Lors de l'activation du récepteur, la sous-unité  $\alpha$  se dissocie des sous-unités  $\beta$  et  $\gamma$  qui restent associées à la membrane. La sous-unité  $\alpha$  échange une molécule de GDP pour une molécule de GTP qui sera ensuite hydrolysée toujours par la sous-unité  $\alpha$  en GDP. Cette activité GTPasique de la sous-unité  $\alpha$  régule ainsi le cycle de la protéine G. La sous-unité  $\alpha_s$  peut être activée constitutivement par ADP ribosylation lorsqu'elle est incubée avec la toxine de choléra. Une arginine en position 201 est impliquée dans cette ADP ribosylation. Une activation permanente de la sous-unité  $\alpha$  peut être aussi obtenue par des analogues non clivable du GTP. Dans les deux cas, il en résulte une activation permanente de la sous-unité  $\alpha_s$  avec stimulation continue de l'effecteur. Une cystéine, en C-terminal, est le site d'une autre modification induite par la toxine diphtérique qui bloque la catalyse de l'échange GTP/GDP dans la sous-unité  $\alpha_i$ .

Les rhodopsines sont couplées à une protéine G appelée transducine. La sous-unité  $\alpha$  de la transducine activée par la rhodopsine va à son tour activer une phosphodiésterase aboutissant à une diminution du taux du GMP cyclique intracellulaire provoquant une fermeture des canaux sodiques, une hyperpolarisation et la génération d'un influx nerveux. Le phénomène d'amplification dans cet exemple a pu être calculé : une molécule de rhodopsine stimulée par absorption d'un photon active à son tour 100 à 500 molécules de transducine ; une molécule de transducine activée aboutit à l'hydrolyse de 3 700 molécules de GMP cyclique par seconde.

La structure primaire des protéines de la famille des sous-unités  $\alpha$  des protéines G est remarquablement conservée. Les sous-unités  $\alpha$  des protéines G interagissent avec les sous-unités  $\beta$  et  $\gamma$  par leur partie N-terminale, avec les récepteurs à sept domaines transmembranaires par leur partie C-terminale. La liaison du GTP fait intervenir plusieurs sites discontinus de contacts, dont l'arginine en position 201 de la sous-unité  $\alpha_s$  qui est le siège de l'ADP ribosylation induite par la toxine de choléra.

Des mutations ponctuelles des protéines G peuvent aboutir à une croissance tumorale de certaines glandes endocrines : une mutation de l'arginine 201 de la sous-unité  $\alpha_s$  par une glutamine aboutit à une activation constitutive de cette sous-unité. Cette mutation somatique est présente dans environ 40 % des adénomes hypophysaires sécrétant de l'hormone de croissance, et, à une moindre fréquence, dans certaines tumeurs thyroïdiennes. L'hypothèse que la

croissance tumorale était bien due à cette mutation somatique a été établie par plusieurs types d'expériences : par mutagenèse dirigée et reconstitution *in vitro* des différents composants des protéines G, on a pu montrer que la substitution de l'arginine 201 par une cystéine et de la glutamine 227 par une arginine provoquait une stimulation constitutive de l'adénylate cyclase. Les protéines ainsi mutées ne sont plus capables d'hydrolyser le GTP en GDP. *In vivo*, une pathologie analogue a été produite chez des souris transgéniques : la fusion du promoteur de l'hormone de croissance avec une sous-unité  $\alpha_s$  mutée aboutit à la production d'adénomes hypophysaires expérimentaux. Les protéines G mutées peuvent ainsi se comporter comme des oncogènes (oncogène *gsp*). Il faut d'ailleurs noter l'homologie structurale des sous-unités  $\alpha$  avec l'oncogène *ras* et le facteur bactérien d'élongation TU. Alors que  $\alpha_s$  hydrolyse le GTP de façon invariable, grâce à son activité GTPasique intrinsèque, p21*ras* et EF-TU hydrolysent le GTP avec une efficacité qui dépend essentiellement de l'effet d'autres protéines (GAP) qui augmentent leur activité catalytique. Un autre oncogène *Gip*<sub>2</sub> correspond à une mutation ponctuelle au niveau de  $\alpha_{12}$ . Cette mutation a été trouvée dans certaines tumeurs surrenaliennes et ovariennes et pourrait être, comme *Gsp*, responsable de la transformation oncogénique de ces tissus.

#### *Désensibilisation des récepteurs à sept domaines transmembranaires*

La désensibilisation des récepteurs couplés aux protéines G a été particulièrement étudiée dans le cas des récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques. La désensibilisation se traduit par une diminution de la réponse maximale et/ou de la sensibilité à un agoniste comme l'isoprotérénol. Plusieurs événements sont impliqués dans cette désensibilisation : une séquestration des récepteurs, une baisse de la transcription du gène mais le phénomène le plus étudié a été celui de la désensibilisation ultra-rapide des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques liée à leur phosphorylation. Deux mécanismes principaux de phosphorylation ont été mis en évidence dans les récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques : une phosphorylation par une protéine kinase A, dépendant de l'AMP cyclique, et une phosphorylation par une kinase spécifique du récepteur, la kinase du récepteur  $\beta$ -adrénergique ( $\beta$ ARK). La phosphorylation du récepteur  $\beta$ -adrénergique par la protéine kinase A intervient à de faibles concentrations de ligand. Elle implique des sites consensus de phosphorylation bien identifiés grâce aux expériences de mutagenèse dirigée. Le récepteur  $\beta_2$ -adrénergique contient deux sites de phosphorylation de la PKA situés l'un dans la troisième boucle intracellulaire, l'autre dans la partie proximale de l'extrémité C-terminale intracellulaire.

La phosphorylation du récepteur  $\beta_2$  par la  $\beta$ ARK intervient pour des concentrations plus élevées d'agoniste, de l'ordre de la micromole. Les sites de phosphorylation de la  $\beta$ ARK sont distincts de ceux de la protéine kinase A et se situent au niveau de l'extrémité C-terminale du récepteur. Ces

phosphorylations du récepteur interviennent donc dans des régions adjacentes à celles impliquées dans l'interaction des sous-unités  $\alpha_s$  avec le récepteur et pourraient ainsi bloquer le couplage. La protéine kinase A peut aussi phosphoryler d'autres récepteurs (désensibilisation hétérologue). La phosphorylation par la protéine kinase A, qui intervient à des concentrations nanomolaires d'agonistes, pourrait s'observer dans les tissus à innervation  $\beta$ -adrénergique tandis que celle induite par la  $\beta$ ARK s'observerait dans les jonctions neuronales où les concentrations de catécholamines sont proches de la micromole. L'action de la  $\beta$ ARK est potentialisée par l'action d'une autre protéine, la  $\beta$ -arrestine qui se lie au récepteur dont la partie C-terminale a été préalablement phosphorylée par la  $\beta$ ARK. Un système homologue existe au niveau des rhodopsines avec une kinase spécifique de la rhodopsine dont l'action est complétée par l'arrestine. Outre cette désensibilisation rapide des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques qui intervient en quelques minutes, existe une régulation transcriptionnelle, intervenant en quelques heures. Il existe une autorégulation négative : l'interaction du ligand avec son récepteur entraîne une diminution du niveau de la transcription du gène du récepteur, médiée par l'AMP cyclique.

#### *Caractérisation et structure des récepteurs de l'angiotensine II*

Deux types de récepteurs de l'angiotensine II ont été mis en évidence par des inhibiteurs peptidiques et non peptidiques de l'angiotensine II. Le récepteur AT1 de l'angiotensine II est un récepteur à sept domaines transmembranaires, couplé au moins à deux protéines G :  $G_i$  (inhibition de l'adénylate cyclase) et  $G_q$  (activation de la phospholipase C produisant l'inositol 1,4,5 triphosphate ( $IP_3$ ) et du diacylglycérol). L'activation du récepteur de l'angiotensine II conduit à une stimulation des phospholipases D et A2, des canaux  $Ca^{++}$  et  $K^+$ . Le récepteur AT1 est sensible au DTT, inhibé par des produits non-peptidiques tels que le DUP 753 dont le  $K_i$  est de l'ordre de  $10^{-8}$  M. Le récepteur AT2, caractérisé par d'autres réactifs pharmacologiques, lie l'angiotensine II de façon similaire mais n'est pas couplé aux protéines G et son mécanisme de couplage est actuellement inconnu. La signification physiologique du récepteur AT2 est actuellement inconnue. Les récepteurs AT1 sont situés au niveau des muscles lisses vasculaires, de la zone glomérulée de la surrénale, du cœur, du rein. Les récepteurs AT2 se trouvent dans la zone médullaire de la surrénale, l'ovaire et l'utérus. Le cerveau contient environ 40 % de récepteurs AT1 et 60 % d'AT2. Le récepteur AT2 se trouve très fortement exprimé lors du développement fœtal, notamment dans des zones où aucun récepteur de l'angiotensine II ne peut être mis en évidence chez l'adulte (muscles squelettiques, graisse, peau). Fait intéressant, certains tissus ou cellules modifient le phénotype de leur récepteur de l'angiotensine lors du développement. Ainsi, l'aorte fœtale contient proportionnellement beaucoup plus de récepteur AT2 que l'aorte adulte.

Le clonage par expression du récepteur AT1 a montré l'existence de sept domaines transmembranaires, de trois sites extracellulaires de glycosylation, d'une partie C-terminale riche en sites potentiels de phosphorylation. Deux sous-types du récepteur AT1 ont été récemment individualisés : le récepteur AT1a présent dans le rein et le muscle lisse vasculaire et le récepteur AT1b, qui diffère du précédent par 17 acides aminés, et situé dans les surrénales. Les deux récepteurs lient de façon similaire les différentes angiotensines, sont inhibés par le DUP 753 mais non par les bloqueurs spécifiques du récepteur AT2. Le récepteur recombinant exprimé de façon stable dans des cellules CHO est couplé à la génération d'IP3 et aux mouvements intracellulaires de calcium.

#### *Voies de signalisation du récepteur de l'angiotensine II*

La stimulation du récepteur de l'angiotensine II surrénalien ou du muscle lisse vasculaire fait intervenir plusieurs voies métaboliques : 1°) Génération d'IP3 à partir du phosphatidyl inositol 4,5-biphosphate par stimulation de la phospholipase C. Cette génération est précoce, fugace, inhibée par les esters de phorbols et indépendante de l'internalisation du complexe récepteur-angiotensine II. L'activation de la phospholipase C aboutit aussi à la génération de diacylglycérol qui, à son tour, stimule la protéine kinase C. La protéine kinase C, peut être aussi activée directement par les esters de phorbol. Sa stimulation par l'angiotensine II dépendrait de l'internalisation du complexe récepteur-angiotensine II. 2°) L'activation du récepteur de l'angiotensine II stimule la phospholipase D qui agit sur la phosphatidyl choline pour produire de l'acide phosphatidique. Ce dernier peut, par l'intermédiaire d'une phosphatidyl hydrolase, générer du diacylglycérol qui stimule la protéine kinase C. La protéine kinase C est donc une enzyme qui peut être à la fois stimulée par la voie de la phospholipase C et de la phospholipase D. Sa stimulation aboutit à la phosphorylation de substrats impliqués dans la génération d'événements conduisant la cellule en mitose. 3°) Le récepteur de l'angiotensine II est couplé négativement à l'adénylate cyclase par l'intermédiaire de  $G_{\alpha i}$ . Ce mécanisme est opérationnel dans l'hypophyse antérieure, la surrénale et le foie, mais ne s'observe pas dans les cellules musculaires lisses vasculaires. 4°) Enfin, l'activation du récepteur de l'angiotensine II agit sur différents canaux, de façon directe ou indirecte. Les canaux potassique ATP-dépendants seraient bloqués par l'angiotensine II ce qui provoquerait une dépolarisation cellulaire, responsable d'une augmentation de la sécrétion d'aldostérone par la surrénale et d'une vasoconstriction par les cellules du muscle lisse vasculaire. Un canal calcium entrant, voltage-dépendant, serait activé par le récepteur de l'angiotensine II. Enfin, la protéine kinase C stimule la phospholipase A2, aboutissant à la production de prostacycline qui pourrait mettre fin à l'action de l'angiotensine II, notamment dans la surrénale.

*Angiotensine II et croissance cellulaire*

Des observations intéressantes ont suggéré que l'angiotensine II, en dehors de son effet vasoconstricteur, pourrait exercer un effet hypertrophique et prolifératif, au niveau du muscle lisse vasculaire. Il est bien établi qu'il existe, au cours de l'hypertension artérielle, une hypertrophie des cellules musculaires lisses vasculaires, aboutissant à une augmentation du calibre des vaisseaux. Cette hypertrophie est réversible grâce à l'action de médicaments antihypertenseurs, tels que les inhibiteurs de l'enzyme de conversion. Le mécanisme de cette action, directe ou indirecte, hypertrophique et proliférative, peut actuellement être abordé grâce aux connaissances récentes sur le récepteur de l'angiotensine II et les phénomènes de croissance cellulaire.

*In vitro*, en culture cellulaire, l'angiotensine II induit la transcription de gènes précoces tels que *c-fos*, *c-myc* et *c-jun*, augmente la synthèse de facteurs de croissance (PDGF) et peut, en présence de sérum de veau fœtal, accroître l'incorporation de thymidine tritiée dans les cellules musculaires lisses vasculaires. Jusqu'à présent, il n'était pas formellement démontré que l'angiotensine II exerce un effet soutenu sur la prolifération cellulaire, indépendamment de la présence de sérum de veau fœtal. Des données du laboratoire montrent que le récepteur AT1 recombinant exprimé dans CHO augmente la croissance cellulaire en dehors d'adjonction de facteurs de croissance, ce qui indiquerait un effet direct mitogénique de l'angiotensine II.

L'angiotensine II pourrait jouer aussi un rôle important dans un autre modèle expérimental, la prolifération néointimale secondaire à une lésion endothéliale. Dans ce modèle, il existe une migration et une prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires aboutissant à une réduction du calibre de l'artère. Les inhibiteurs de l'enzyme de conversion et les antagonistes de l'angiotensine II inhibent en grande partie cette prolifération néointimale. Il est donc possible que l'angiotensine II soit non seulement un facteur de régulation de l'hémodynamique cardiovasculaire mais joue aussi un rôle important comme facteur adjuvant de croissance des cellules musculaires lisses vasculaires.

P. C.

*Programme des séminaires :*

10 janvier 1992 : J. SASSARD (Université de Lyon Rockefeller, Lyon) \*.  
« Le rôle pathogénique du système rénine-angiotensine dans l'hypertension génétique du rat ».

---

\* Le cours ainsi que le séminaire du 10 janvier 1992 ont eu lieu à l'Université Rockefeller de Lyon.

20 janvier 1992, J. POUYSSÉGUR (Centre de Biochimie du CNRS, Nice). « Le récepteur de la thrombine ».

27 janvier 1992, G. VASSART (Université Libre de Bruxelles, Belgique). « Récepteurs de la TSH et de l'adénosine dans la glande thyroïde ».

3 février 1992, J. BOCKAERT (Centre CNRS/INSERM de Pharmacologie, Montpellier). « Structure et fonction des protéines G couplées aux récepteurs à 7 domaines transmembranaires ».

10 février 1992, J. HANOUNE (INSERM U99, Créteil). « L'adénylate cyclase de cerveau chez l'homme ; clonage, localisation chromosomique et localisation *in situ* ».

17 février 1992, E. MILGROM (INSERM U135, Bicêtre). « Récepteurs des hormones glyco-protéiques hypophysaires ».

24 février 1992, S. JARD (Centre CNRS/INSERM de Pharmacologie, Montpellier). « Mode d'action de peptides vaso-actifs : vasopressine et angiotensine II ».

9 mars 1992, E. CLAUSER (INSERM U36, Paris). « La famille de l'oncogène *mas* : relations avec le récepteur de l'angiotensine II ».

16 mars 1992, D. STROSBURG (Institut de Génétique Moléculaire — CNRS, Paris). « Récepteur  $\beta$ 3-adrénergique ».

#### RAPPORT D'ACTIVITÉ DU LABORATOIRE

### I. BIOLOGIE MOLÉCULAIRE DE L'ENZYME DE CONVERSION ET POLYMORPHISME DES GÈNES CONTRÔLANT LA PRESSION ARTÉRIELLE

Equipe : F. SOUBRIER, C. HUBERT, A.-M. HOUOT, P. TESTUT, S. NADAUD, Y. KOTELEVTSOV, M.C. ZENNARO, E. VILLARD, J.D. LALAU

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

L'enzyme de conversion de l'angiotensine I (ECA), ou dipeptidyl carboxypeptidase I (DCP I), appartient à la classe des métallo-peptidases à zinc. Sa principale activité physiologique concerne le métabolisme des peptides vaso-actifs, angiotensine et bradykinine. Elle mature l'angiotensine I en angiotensine II, par clivage d'un dipeptide à son extrémité carboxyterminale. Elle dégrade 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, et une forme circulante ou soluble.

L'enzyme de conversion endothéliale, exprimée dans les cellules somatiques, a été clonée et séquencée. Cette enzyme présente une homologie interne qui permet de distinguer deux domaines occupant chacun environ une moitié de la molécule. Chaque domaine comporte une séquence consensus du site actif des métallopeptidases à zinc. L'extrémité C-terminale comporte une région hydrophobe qui constitue le peptide d'ancrage de l'enzyme dans la membrane plasmique, comme l'ont montré les expériences d'expression *in vitro* de l'ECA.

La séquence primaire de l'isoforme plus courte de l'ECA, exprimée dans les cellules germinales, a également été déterminée par clonage de l'ADNc chez l'homme. L'isoforme germinale ne contient que le seul domaine C-terminal de l'ECA somatique, avec lequel l'identité est totale, en accord avec l'existence d'un seul gène. Un peptide à l'extrémité N-terminale est spécifique de la forme germinale. L'expression de cette forme n'est présente qu'à certains stades de développement des cellules germinales mâles, après la méiose. Le rôle de l'ECA germinale n'est pas connu.

Le clonage du gène de l'ECA chez l'homme et la détermination de la structure intron-exon nous a permis de montrer que le transcrite somatique de l'ECA est codé par les douze premiers exons puis par les exons 14 à 26. L'ARN messager de l'ECA germinale est transcrite à partir de l'exon 13, codant pour la région spécifique de l'ECA germinale, et des exons 14 à 26.

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

— *Identification des régions régulatrices de la transcription de l'ECA somatique dans différents types cellulaires*

Comme nous l'avons vu, la forme somatique de l'enzyme est exprimée dans de nombreux types cellulaires, épithéliaux, neuro-épithéliaux et endothéliaux. Différentes lignées cellulaires où l'ECA s'exprime sont utilisées pour analyser, par transfection *in vitro*, le rôle des différentes régions du promoteur de l'ECA dans la transcription du gène dans plusieurs de ces types cellulaires. 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, on mesure l'efficacité respective de chaque construction sur la transcription dans les cellules KAKO-2, d'origine intestinale, les cellules Tera-1, issues d'un tératocarcinome sécrétant de l'ECA principalement somatique, et dans les cellules endothéliales immortalisées de lapin (collaboration avec M<sup>me</sup> Denise Paulin, Institut Pasteur). Les transfections sont également réalisées dans les cellules HepG2, qui ne synthétisent pas d'ECA et qui servent de contrôle négatif. Les résultats obtenus montrent des différences dans le rôle respectif de chacune des régions du promoteur suivant

les types cellulaires et l'existence de séquences ayant un effet positif et d'autres ayant un effet négatif sur la transcription.

— *Etude du promoteur de l'ECA germinale*

L'expression exclusive de l'ECA germinale dans les cellules germinales haploïdes rend illusoire le développement et l'utilisation d'une lignée cellulaire correspondant à ce stade de maturation des cellules germinales. Néanmoins, l'étude du promoteur a pu être réalisée dans les cellules Tera-1, malgré des difficultés initiales importantes. Outre ces cellules, le promoteur a également été étudié dans d'autres types cellulaires, tels que les cellules endothéliales et les cellules HepG2 citées plus haut. Nous avons obtenu une transcription significative du gène reporter placé sous le contrôle de l'intron 12 du gène de l'ECA. Ces résultats montrent que l'intron 12 est bien le promoteur alternatif germinale de l'ECA. De plus, nous avons montré que certaines régions du promoteur reconnaissent des facteurs *trans*, modifiant le niveau de la transcription et présents dans d'autres lignées que la lignée où il s'exprime naturellement (S. Nadaud).

b) *Rats transgéniques pour le gène de l'ECA humaine*

Ce programme est réalisé en collaboration avec John Mullins à Edinbourg et est actuellement en cours. Un cosmide contenant le gène entier de l'ECA a été isolé et est utilisé pour réaliser des micro-injections dans le pronucleus d'œufs fertilisés.

L'intérêt de ces expériences est essentiellement physiologique. L'intégration de multicopies du gène de l'ECA permettra notamment d'évaluer l'effet d'une surexpression de l'ECA chez un animal. Cette approche devrait permettre d'éclairer le problème du rôle limitant ou non de l'ECA dans la génération d'angiotensine II et la dégradation de bradykinine dans le plasma ou dans les tissus. La disponibilité d'inhibiteurs de l'ECA mais aussi d'antagonistes de l'angiotensine II et d'antagoniste du récepteur B<sub>2</sub> de la bradykinine, permettra d'analyser de façon séparée les effets de l'ECA sur la voie de la formation de l'angiotensine II et de la dégradation de la bradykinine (P. Testut, C. Hubert).

c) *Effet du polymorphisme du gène de l'ECA sur 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'analyse de ségrégation démontrait également l'effet d'un gène majeur.

A l'aide d'un polymorphisme de type insertion/délétion (I/D) dans le gène de l'ECA, nous avons démontré une association forte 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 DD, ID et II sont de 494.1, 392.6, et 299,3 mg/L, respectivement. 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). Une nouvelle étude familiale, combinant l'étude des concentrations plasmatiques et du génotype a permis de préciser que le marqueur I/D n'était pas le variant du gène responsable des différences d'expression. En effet, la fréquence du gène majeur, calculée par analyse de ségrégation, n'est pas la même que les fréquences alléliques du marqueur. Nous avons également montré l'absence de relation entre ce polymorphisme et la PA dans ces familles nucléaires normales.

Notre principal projet dans ce domaine est de déterminer la nature moléculaire du variant du gène de l'ECA responsable de la différence d'expression que nous avons mise en évidence.

## *2 - Polymorphisme des gènes contrôlant la pression artérielle*

La variance 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 variants génétiques responsables des variations de la PA ne sont pas facilement 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.

### *a) Développement de nouveaux marqueurs hautement informatifs pour les gènes candidats*

Dans l'analyse d'une maladie complexe et multifactorielle, il est établi que de disposer de marqueurs hautement informatifs positionnés sur les gènes à étudier permet d'augmenter la puissance des études génétiques familiales. Les marqueurs sont d'autant plus informatifs que le nombre d'allèles est impor-

tant. C'est pourquoi nous nous sommes tournés vers les marqueurs génétiques polymorphes de type microsatellites. Les différents allèles d'un marqueur microsatellite viennent de la répétition d'un motif dinucléotidique élémentaire, un nombre variable de fois d'un individu à l'autre. Les motifs (CA) ou leurs complémentaires (GT) sont les plus fréquents et sont retrouvés de façon régulièrement répartie dans tout le génome.

Nous avons isolé une telle répétition dans le gène de l'angiotensinogène humain et nous avons utilisé ce marqueur pour tenter d'impliquer, ou non, ce gène dans le développement de l'hypertension essentielle et dans la régulation de l'angiotensinogène dans le plasma. Nos premiers résultats sont tout à fait prometteurs et tendraient à désigner l'angiotensinogène comme potentiellement impliqué dans l'HTA essentielle. De façon tout à fait intéressante, la même étude réalisée avec un marqueur du gène de la rénine avait donné des résultats totalement négatifs. Cette étude a été réalisée avec la collaboration d'une part du groupe de J.-M. Lalouel à Salt Lake City et d'autre part celui de F. Cambien à l'U 258 de l'INSERM (Y. Kotelevstev).

Le développement de marqueurs de ce type est également en cours pour d'autres types de gènes ou de locus potentiellement impliqués dans l'hypertension artérielle.

*b) Structure du gène du récepteur minéralocorticoïde et recherche d'une anomalie de structure dans le pseudo-hypoaldostéronisme*

Le pseudohypoaldostéronisme est un syndrome de perte de sel du nouveau-né, associé à une hyperkaliémie, malgré un taux d'aldostérone élevé dans le plasma. Une anomalie de la liaison de l'aldostérone à son récepteur a été montrée chez les patients atteints de pseudo-hypoaldostéronisme. Une résistance à l'aldostérone due à une anomalie de structure du gène du récepteur minéralocorticoïde est donc envisageable en priorité dans cette affection. Nous avons voulu tester cette hypothèse dans deux familles où plusieurs membres sont atteints par cette affection. Pour cela, nous avons réalisé un séquençage direct de l'ADNc du récepteur, chez les individus atteints, par transcription réverse et amplification de l'ARN messenger du récepteur présent dans les leucocytes mononucléaires. Cette technique est lourde car elle implique l'extraction des ARN des cellules circulantes, ce qui ne peut être réalisé de façon simple. Aucune mutation n'a été décelée chez les deux individus analysés. Afin de pouvoir étudier un plus grand nombre de patients au niveau de l'ADN génomique codant pour le récepteur minéralocorticoïde, nous avons débuté le clonage du gène du récepteur et la détermination de la structure intron-exon (M.-C. Zennaro, Y. Kotelevstev).

c) *Détection d'une mutation sur le gène de la rénine associée à une élévation de la prorénine plasmatique*

La rénine est synthétisée sous forme d'un précurseur, la préprorénine. Le clivage protéolytique du peptide signal ou pré-fragment conduit à la formation de prorénine inactive. C'est le clivage du pro-fragment par une enzyme de maturation qui permet l'activation de la prorénine en rénine. Dans le plasma, la majeure partie de la rénine circule sous forme de pro-rénine inactive.

Dans le cadre d'une grande étude épidémiologique sur l'hypertension artérielle réalisée aux Pays-Bas, une famille a été identifiée où le père et un fils ont des taux de prorénine plasmatique élevés. Nous avons émis l'hypothèse que cette élévation familiale de la prorénine pouvait être due à une anomalie de séquence du gène et réalisée par la même technique que pour le récepteur minéralocorticoïde, un séquençage direct des produits d'amplification de tous les exons du gène rénine à partir de l'ADN génomique. Aucune anomalie n'a été retrouvée au niveau du site de clivage du profragment de la rénine, ni au niveau des sites potentiels de N-glycosylation. En revanche, une transition C-T a été identifiée dans la région C-terminale de la rénine, réalisant un codon stop prématuré et la suppression d'un peptide de l'extrémité C-terminale. Nous allons tester la fonctionnalité de cette mutation en recréant une mutation identique par mutagenèse *in vitro* de l'ADNc de la préprorénine et montage dans un vecteur d'expression. Ce vecteur sera transféré dans une lignée cellulaire capable de maturer la prorénine (lignée aTt-20) et une comparaison de la maturation de la préprorénine sauvage avec la préprorénine mutée sera effectuée (J.-D. Lalau, E. Villard, A.-M. Houot).

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

Equipe : E. CLAUSER, C. AUZAN, L. WEI, I. LECONTE, C. MONNOT, C. BIHOREAU, B. TEUTSCH, E. DAVIES, S. CONCHON, B. PHILIBERT

L'activité scientifique du groupe au cours de l'année 1991-1992 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*

La fonction enzymatique des deux domaines catalytiques de l'enzyme de conversion a été étudiée par expression isolée de chacun des deux domaines

et production d'enzymes mutées sur des résidus essentiels de l'un ou l'autre de ces sites. Cette étude nous a montré que les deux sites étaient actifs et capables de lier avec une même affinité l'angiotensine I, mais avec une constante catalytique différente. Le domaine N-terminal moins actif présente une sensibilité au chlore et une vitesse de dissociation des inhibiteurs de l'enzyme différentes. De plus, le spectre d'inhibition par différents inhibiteurs de l'enzyme de conversion n'est pas le même pour les deux sites.

#### b) *Angiotensinogène humain*

Nous avons entrepris de produire en grande quantité deux formes mutées de l'angiotensinogène humain. Le premier mutant présente une modification du site de clivage de la rénine (Phe-Phe au lieu de Leu-Val) ce qui nous permettra d'étudier le rôle potentiellement inhibiteur de cette protéine sur la rénine. Pour le deuxième mutant, le changement de Phe8 de la séquence de l'angiotensine I en Ala nous permettra de produire un angiotensinogène dont le clivage produira un antagoniste peptidique de l'angiotensine II. Après caractérisation *in vitro* de ces deux protéines, les séquences d'ADN correspondantes seront introduites dans des ovocytes de rats et les rats transgéniques correspondants seront étudiés.

#### c) *Le récepteur de l'angiotensine II*

Ayant obtenu la séquence d'ADNc du récepteur AT1a de rat nous avons entrepris sa caractérisation dans différentes directions.

\* Expression du récepteur AT1a dans CHO et caractérisation pharmacologique et fonctionnelle de ce récepteur. Nous avons pu ainsi montrer que ce récepteur était impliqué dans la production intracellulaire d'inositol phosphates et la mobilisation de calcium (technique Indo1), qu'un effet spécifique de l'AII sur la synthèse d'AMPc était observée. Dans ces cellules enfin et par l'intermédiaire du récepteur AT1a, l'angiotensine II est impliquée dans la croissance cellulaire et le métabolisme glucidique.

\* Nous tentons de caractériser une batterie d'anticorps polyclonaux antipeptidiques, vis-à-vis du récepteur AT1.

\* Plusieurs mutants du récepteur AT1a sont actuellement caractérisés afin d'identifier les séquences en acides aminés impliqués dans la liaison de l'AII et des antagonistes non peptidiques.

\* Le gène humain du récepteur AT1 a été cloné et séquencé.

#### d) *Récepteur de l'insuline*

L'analyse des rapports structure/fonction du récepteur de l'insuline se poursuit dans trois directions :

\* Poursuite de l'analyse de mutants de glycosylation, montrant le rôle de

certaines chaînes oligosaccharides du récepteur dans la transmission du message hormonal. La localisation des chaînes en cause et les mécanismes par lesquels elles interviennent sont actuellement explorés.

\* Etude du rôle du domaine transmembranaire dans la transmission du message hormonal.

\* Tentative de transformation de l'enzyme tyrosine-kinase du récepteur de l'insuline, en une sérine-kinase et étude des conséquences fonctionnelles de ces modifications.

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

Equipe : M.-T. CHAUVET, A. MICHAUD, V. BELDENT

#### A - Objectifs

1) 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 :

— 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 l'ADNc correspondant à la forme membranaire des cellules endothéliales vasculaires humaines.

— Une forme soluble isolée du plasma humain ou du milieu de culture de CHO transfectées par l'ADNc correspondant à la forme membranaire.

2) 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.

#### B - Techniques

##### 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 gel de sépharose couplé à l'inhibiteur (Lisinopril) au moyen d'un bras de 28 Å au lieu de 14 Å.

Pour l'obtention des formes recombinantes, nous effectuons une culture intensive des CHO recombinantes et nous mettons actuellement au point une méthode de purification par électrophorèse préparative.

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

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 permet de caractériser les trois premiers résidus N-terminaux d'une séquence.

### c) Détermination de l'extrémité C-terminale

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 la caractérisation de l'extrémité C-terminale :

— action des carboxypeptidases Y et P, sur des quantités de 250 picomoles de protéine par cinétique ;

— 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.

### C - Résultats préliminaires

— 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.

— L'ECA membranaire a une extrémité C-terminale qui correspond à la totalité de celle déduite de la séquence de l'ADNc.

— L'extrémité C-terminale de la forme soluble ECA sécrétée par les cellules CHO transfectées par l'ADNc de la forme membranaire correspond à une protéolyse localisée au niveau du résidu d'arginine 1137 ou 1227. Des anticorps polyclonaux dirigés contre des peptides de séquences homologues à celles de régions où se situent les deux sites alternatifs de protéolyse : séquences (1126-1137), (1135-1148), (1152-1162), (1214-1227) ont été obtenus et sont en cours d'étude.

— Nous recherchons la nature et la localisation de l'enzyme responsable de la formation de la forme sécrétée de l'ECA chez les CHO, en évaluant l'effet d'inhibiteurs ou de cofacteurs, compatibles avec la survie cellulaire, sur la production d'ECA soluble et en soumettant *in vitro* de l'ECA membranaire solubilisée par du Chaps ou en position sur la membrane à l'action de diverses fractions de cellules CHO sauvages.

#### IV. RÉGULATION DE L'EXPRESSION DE LA RÉNINE

Equipe F. PINET, P. BORENSTEIN, J. PHILIPPE, R. DELLA BRUNA, N. RIOUAL, T. KONOSHITA, S. FUCHS

##### 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  $0,1 \times 10^{-9}$  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  $\mu$ 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.

En utilisant des constructions associant la région 5' du gène de la rénine et la luciférase comme gène reporteur, les trois premières constructions ont montré 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 avons cartographié plus précisément les 600 premières paires de bases du gène de la rénine en utilisant les constructions obtenues avec l'exonucléase 3 (- 504, - 455, - 374, - 276, - 269, - 130, - 111, - 55). Nous avons localisé un « silencer » entre les paires de bases 130 et 269. La plus forte activité du promoteur est obtenue avec les constructions - 130, - 111 et - 55. Comme contrôle négatif, nous avons évalué toutes les constructions dans les cellules JEG-3 et montré une activité très faible du promoteur dans ces cellules non-productrices de rénine. Nous avons testé l'effet de la forskoline (activateur de l'adénylate cyclase indépendamment d'un récepteur) et montré que la forskoline stimulait 3,5 fois l'activité du promoteur de la rénine pour les constructions comprenant les 276 premières paires de bases. Par analyse de la séquence, il y aurait un site consensus d'un élément répondant à l'AMP cyclique à - 221 paires de base.

En gel de retardation, nous avons montré la liaison de facteurs nucléaires

sur les régions du promoteur comprises entre - 276 et - 150 et entre - 154 et - 105. Les expériences d'empreinte devraient nous permettre de déterminer les séquences d'ADN sur lesquelles se lient ces facteurs *trans*.

La régulation de la transcription du messenger rénine a aussi été étudiée en culture de cellules chorioniques. La quantification des messagers par RT/PCR (Reverse Transcriptase sur les ARN puis réaction de PCR) a été mise au point. Les deux primers ont été choisis de manière à pouvoir différencier l'amplification de l'ARN messenger de l'ADN génomique. La mise au point de la concentration de magnésium (6 mM) et du nombre de cycles ( $n = 30$ ), nous a permis d'avoir une PCR « quantifiable ». Un standard interne a été mis au point avec une insertion de 60 paires de base au milieu du fragment que l'on amplifie. Les deux fragments amplifiés (standard interne et ARN de cellules chorioniques) sont séparables sur gel de polyacrylamide et détectable en BET. Les bandes sont comptées (chaque réaction de PCR est faite en présence de  $0,5 \mu\text{Ci } ^3\text{H-}\alpha\text{dCTP}$ ), ce qui permet de quantifier précisément la quantité de messenger. La sensibilité de cette méthode nous permet de détecter le messenger rénine présent dans 25 cellules. Les premières expériences de régulation nous ont permis de montrer que la forskoline ne stimule pas le taux de messenger rénine, par contre le TPA induit une stimulation de 3 fois du messenger et cet effet est potentialisé en présence de forskoline. Sur les mêmes expériences, nous avons montré une corrélation du taux de messenger rénine et du taux de rénine présent dans le milieu de culture (P. Borensztein, N. Rioual, J. Philippe, F. Pinet).

b) *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 Zürich, 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 ( $n = 30$ ) nous a permis d'avoir une PCR « quantifiable ». A l'heure actuelle, en gel d'acrylamide, nous pouvons détecter les produits amplifiés de manière quantitative à partir de  $2 \mu\text{g}$  jusqu'à 32 ng d'ARN.

Un standard interne a été aussi mis au point et est identifiable par sa taille puisqu'il présente une insertion de 60 paires de base et est ajouté dans chaque réaction de RT/PCR. Des expériences de régulation ont été effectuées. L'effet de la forskoline et de l'isoprotérénol a été évalué à différents temps (1 h, 3 h, 6 h, 14 h et 20 h). Par cette technique très sensible, nous pouvons détecter

une faible stimulation du messenger rénine par l'AMP cyclique dès 1 heure. A 20 heures, différents agents induisant une augmentation de l'AMP cyclique ont été testés et stimulent la transcription du messenger rénine : forskoline (facteur 2,85), isoprotérénol (facteur 1,75), IBMX (facteur 2,05), dibutyryl cAMP (facteur 1,6), histamine (facteur 1,68) et bradykinine (facteur 1,34).

Cette technique nous permet d'étudier la régulation de la transcription du messenger rénine de souris en culture primaire de cellules juxtaglomérulaires, ce qui n'aurait pas été possible par les techniques classiques de mesure des messagers (Northern blot) (R. Della Bruna).

c) *Etude des enzymes de maturation dans les tissus surrénaliens chez l'homme*

Plusieurs prohormones convertase de la famille des subtilisines ont été clonées chez la souris et chez l'homme. La disponibilité de sondes humaines PC1 et PC2 nous a permis de rechercher si les messagers codant pour PC1 et PC2 étaient présents dans les différents tissus surrénaliens que nous avons à notre disposition [surrénales normales, adénomes de Conn (hyperaldostéronisme primaire), phéochromocytomes, indidentalomes (tumeurs non sécrétantes) et adénomes ou corticosurrénalomes sécrétant du cortisol (Cushing)]. La présence de PC1 et PC2 n'a pu être démontrée que dans les phéochromocytomes où le messenger est particulièrement abondant.

En utilisant une sonde spécifique des granules chromaffines (dopamine  $\beta$ -hydroxylase), nous espérons pouvoir caractériser en hybridation *in situ* le type cellulaire où est présent PC1 et PC2 (T. Konoshita).

V. *ÉTUDE MORPHOLOGIQUE (IMMUNOHISTOLOGIE ET HYBRIDATION IN SITU) ET ULTRASTRUCTURALE DES ENZYMES DU SYSTÈME RÉNINE-ANGIOTENSINE*

Equipe : J.-M. GASC, Françoise MONGIAT, Mathilde SIBONY, M.-T. MORIN, S. SHANMUGAM

a) *Rénine et PC2*

La rénine active et son précurseur inactif, la prorénine, coexistent en proportions variables dans les tissus normaux et tumoraux sécrétant la rénine. Un double immunomarquage à l'or colloïdal avec des anticorps dont l'un est spécifique du prosegment de la prorénine, a montré sur deux tumeurs à rénine une relative abondance de la forme inactive par rapport à la forme active. Une étude ultrastructurale en cours montrera si la prorénine, qui est très abondante dans ces tumeurs, est stockée dans les mêmes granules de sécrétion que la rénine active, ou si elle suit une voie de sécrétion constitu-

tive. L'hybridation *in situ* confirme le très haut niveau d'expression de la rénine dans ces tumeurs.

La maturation de la prorénine en rénine active est assurée par une enzyme qui n'a pas encore été identifiée avec certitude. Parmi plusieurs possibilités, il avait été proposé que PC2, une enzyme de maturation des protéines présente dans le pancréas endocrine et l'hypophyse, pourrait assurer cette fonction. Les premiers résultats d'hybridation avec un cARN de PC2 ne sont pas en faveur de cette hypothèse car nous n'avons pas pu détecter de signal d'hybridation dans les tumeurs à rénine ou dans les cellules juxtaglomérulaires.

b) *Enzyme de conversion de l'angiotensine I (ECA)*  
(en collaboration avec D. Segretain)

Le travail sur la forme testiculaire (ou germinale) de l'ECA a été particulièrement développé. Cette isoforme de l'enzyme, bien que transcrite à partir du même gène, est plus courte que l'enzyme endothéliale (P.M. 90-100 kDa au lieu de 160-170 kDa). Elle est présente seulement dans les cellules germinales et sa fonction est inconnue.

Son apparition dans les cellules germinales au cours de la méiose chez le rat et la souris prépubère et adulte a été étudiée par immunohistologie avec des anticorps spécifiques des différents segments de la molécule, et par hybridation *in situ* avec des ribosondes.

Par hybridation, chez le rat et la souris, le signal de l'ARNm de l'ECA apparaît dans les cellules germinales au stade spermatide ronde et augmente rapidement au cours de la spermiogénèse. Dès que le stade spermatozoïde est atteint le signal d'hybridation diminue pour devenir indétectable sur les spermatozoïdes dans la lumière.

Chez la souris, l'utilisation d'anticorps spécifiques des séquences peptidiques N- et C-terminales montre que l'ECA est d'abord présente dans l'appareil de Golgi des cellules germinales au stade spermatide ronde. Aux stades ultérieurs, elle apparaît dans le cytoplasme, à la membrane plasmique (y compris celle recouvrant le flagelle) et dans l'acrosome (organite dérivé du Golgi). La protéine est présente aussi dans les corps résiduels. Après la libération des spermatozoïdes dans la lumière des tubes séminifères, alors que les ARNms ne sont plus détectables, l'ECA est toujours présente sur la membrane plasmique et sur l'acrosome.

Au cours de la maturation sexuelle de la souris, l'ECA et son ARNm apparaissent entre 21 et 23 jours postpartum. A cet âge, la première vague de cellules germinales atteint le stade spermatide. La protéine apparaît d'abord seulement dans le Golgi de quelques rares cellules germinales dans certains tubes séminifères. Quelques jours plus tard, les cellules positives sont plus nombreuses et l'enzyme est localisée aussi à la membrane plasmique.

Deux souches de souris mutantes, caractérisées par une stérilité due à une anomalie méiotique (souches oligotriche et back-cross), expriment l'ECA seulement dans la mesure où leurs cellules germinales atteignent le stade spermatide. Ainsi chez la souris oligotriche, la plupart des cellules germinales atteignent ce stade et expriment l'ECA alors que chez la souris back-cross très peu de cellules finissent la méiose et expriment l'enzyme. L'achèvement de la méiose semble être une condition essentielle préalable à l'expression de l'ECA.

Il existe donc une corrélation évidente entre le début de la spermiogénèse et l'expression de l'ECA. L'isoforme germinale de cette enzyme fait donc partie de ces nombreuses protéines exprimées exclusivement dans les cellules germinales mâles et qui présentent un contrôle temporel d'expression directement lié au cours de la méiose. Les facteurs endocriniens assurant ce contrôle vont être étudiés, ainsi que le trafic intracellulaire de l'ECA dans les cellules germinales mâles.

#### BIBLIOGRAPHIE

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.

ALHENC-GELAS F., RICHARD J., COURBON D., WARNET J.M. and CORVOL P. Distribution of plasma angiotensin I-converting enzyme in healthy men. Relationship to environmental and hormonal parameters. *J. Lab. Clin. Med.*, 117 : 33-39, 1991.

WEI L., ALHENC-GELAS F., CORVOL P. and CLAUSER E. The two homologous domains of the human angiotensin I-converting enzyme are both catalytically active. *J. Biol. Chem.*, 266 : 9002-9008, 1991.

PLOUIN P.F., BATTAGLIA C., ALHENC-GELAS F. and CORVOL P. Are angiotensin converting enzyme inhibition and aldosterone antagonism equivalent in hypertensive patients over fifty ? *Am. J. Hypertens.*, 4 : 356-362, 1991.

ANDRESSEN R., BAIER W., CORVOL P., PINET F. and CELIO M.R. Monoclonal antibodies against a human juxtaglomerular epithelioid granular cell tumor. *Acta Anatomica*, 140 : 130-134, 1991.

MONNOT C., WEBER V., STINNAKRE J., BIHOREAU C., TEUTSCH B., CORVOL P. and CLAUSER E. Cloning and functional characterization of a novel *mas*-related gene, modulating intracellular angiotensin II action. *Mol. Endocrinol.*, 5 : 1477-1487, 1991.

CORVOL P. and MENARD J. Renin purification and cloning. *Hypertension*, 18 : 252-256, 1991.

HUBERT C., HOUOT A.M., CORVOL P. and SOUBRIER F. Structure of the Angiotensin I-converting enzyme gene. Two alternate promoters correspond to evolutionary steps of a duplicated gene. *J. Biol. Chem.*, 266 : 15377-15383, 1991.

KOTELEVTSYEV Y., CLAUSER E., CORVOL P. and SOUBRIER F. Dinucleotide repeat polymorphism at the human angiotensinogen gene. *Nucl. Acid Res.*, 19 : 6978, 1991.

HILBERT P., LINDPAINNER K., BECKMANN J.S., SERIKAWA T., SOUBRIER F., DUBAY C., CARTWRIGHT P., DE GOUYON B., JULIER C., TAKAHASHI S., VINCENT M., GANTEN D., GEORGES M. and LATHROP G.M. Chromosomal mapping of two genetic loci associated with blood pressure regulation in hereditary hypertensive rats. *Nature*, 353 : 521-529, 1991.

RIGAT B., HUBERT C., CORVOL P. and SOUBRIER F. PCR detection of the insertion/deletion polymorphism of the human angiotensin converting enzyme gene (DCP1) (dipeptidyl carboxypeptidase 1). *Nucl. Acids Res.* 20 : 1433, 1991.

1992

JEUNEMAITRE X., RIGAT B., CHARRU A., HOUOT A.M., SOUBRIER F. and CORVOL P. Sib pair linkage analysis of renin gene haplotypes in human essential hypertension. *Hum. Genet.* 88 : 301-306, 1992.

DELLA BRUNA R., PINET F., CORVOL P. and KURTZ A. Calmodulin antagonists stimulate the secretion and inhibit the synthesis of renin in culture mouse renal juxtaglomerular cells. *Am. J. Physiol.*, 262 : F397-F402, 1992.

#### EXPOSÉS, CONGRÈS

Monsieur Pierre Corvol a donné, à Edinbourg, en décembre 1991 la Stanley Davidson Lecture au Collège Royal de Médecine. Il a donné une série de conférences au Brésil (Université de Ribeirao-Preto) du 28 mars au 6 avril 1992 ainsi qu'au Canada (Institut de Recherches Cliniques de Montréal) du 20 au 24 avril 1992. Il a fait une conférence au 14th Scientific Meeting of the International Society of Hypertension, Madrid, Juin 1992.

Monsieur Eric Clauser a participé aux colloques et symposium suivants : Bases moléculaires de l'insulinorésistance - 35<sup>es</sup> Journées Internationales H.P. Klotz d'Endocrinologie Clinique - Paris - 14-15 mai 1992 ; 14th Scientific Meeting of International Society of Hypertension - Madrid - Spain - June 14-19, 1992.

Monsieur Florent Soubrier a participé aux colloques et symposium suivants : 14th Scientific Meeting of International Society of Hypertension - Madrid - Spain - June 14-19, 1992.

Mademoiselle Florence Pinet a participé aux colloques et symposium suivants : 14th Scientific Meeting of International Society of Hypertension - Madrid - Spain June 14-19, 1992.

#### 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) ; Maîtrise de Biochimie - Université Paris-Sud (Pharmacie) ; DEA Structure et Fonctionnement des Systèmes Biologiques Intégrés (B. Ros-signal - Paris XI).

## LISTE DES DIPLÔMÉS

1991-1992

*DEA*

Sophie NADAUD - DEA d'Endocrinologie - Paris XI.

Mathilde SIBONY - DEA de Physiopathologie Cellulaire et Moléculaire des Maladies Nutritionnelles et Inflammatoire - Paris VI.

*Thèses*

Lei WEI : « *Biosynthèse et Propriétés Enzymatiques et Pharmacologiques de l'enzyme de conversion de l'angiotensine I* ». 3 décembre 1991.