

Médecine expérimentale

M. Pierre CORVOL, professeur

L'endothélium des parois vasculaires est un véritable organe de 2 Kgs, couvrant 1 000 m² de surface et assurant de nombreuses fonctions. Il inhibe la coagulation du sang, métabolise certaines hormones circulantes, constitue une barrière sélective aux protéines plasmatiques, synthétise des facteurs de croissance qui agissent sur les éléments figurés du sang et au niveau des cellules musculaires lisses vasculaires sous-jacentes, transporte des lipoprotéines et des substances vasoactives dans la paroi vasculaire. Ces différentes fonctions impliquent la mise en jeu de signaux et de communications locales pour capter et décoder les différents messages sanguins hémodynamiques, chimiques et biologiques, afin de les transformer et les transmettre à la paroi vasculaire. Le cours de la Chaire de Médecine Expérimentale : « Signaux et communications dans la paroi vasculaire » s'est surtout attaché aux données récentes sur le rôle de l'endothélium dans la régulation du tonus vasculaire. L'endothélium exerce des effets à court terme en modulant le tonus vasculaire par la production de substances vasorelaxantes (prostacycline, bradykinine et monoxyde d'azote) et vasocontracturantes (endothéline, angiotensine II). A long terme, l'endothélium influence la structure de la paroi artérielle en produisant des facteurs qui stimulent (endothéline, angiotensine II) ou inhibent (monoxyde d'azote) la croissance des cellules musculaires lisses vasculaires. Ainsi, la cellule endothéliale joue un double rôle en contrôlant l'état de tension du vaisseau — et par là réglant le débit sanguin tissulaire — et la structure de la paroi artérielle.

Rôle du monoxyde d'azote dans le tonus vasculaire

En 1980, Furchgott et Zawadzki faisaient une observation d'importance considérable : l'acétylcholine entraîne une vasorelaxation dans des anneaux aortiques dont l'endothélium est intact ; lorsque l'endothélium est mécaniquement ou chimiquement détruit, l'acétyl choline n'exerce plus aucun effet ou devient contracturante. Ceci impliquait la présence d'un facteur dérivé de

l'endothélium, capable de médier la vasorelaxation de l'acétylcholine (endothelium derived relaxing factor, EDRF). Quelques années plus tard, on a pu démontrer que l'EDRF était le monoxyde d'azote. Les cellules endothéliales stimulées par des agents comme la bradykinine libèrent un produit labile, identifié par chimioluminescence, le monoxyde d'azote. La cellule endothéliale synthétise à partir de la L-arginine le monoxyde d'azote qui diffuse dans la cellule musculaire lisse vasculaire sous-jacente. Le monoxyde d'azote interagit avec la guanylate cyclase soluble des cellules musculaires lisses vasculaires pour produire le GMP cyclique qui lui-même, par une série de phosphorylations, entraîne une vasorelaxation.

L'importance du monoxyde d'azote a pu être étudiée de façon précise par des inhibiteurs de la NO synthase, comme le L-NMMA ou la L-NAME, antagonistes compétitifs de l'enzyme. Il existe au moins trois formes de NO synthase : endothéliale, neuronale et macrophagique. La NO synthase des cellules endothéliales et des neurones sont toutes les deux constitutives et stimulables par l'élévation du calcium intracellulaire. La NO synthase macrophagique est inductible, son activité est indépendante du calcium intracellulaire et du complexe calcium-calmoduline. La NO synthase endothéliale est stimulée par de nombreux agents qui élèvent le calcium intracellulaire : acétylcholine, bradykinine, sérotonine, ATP, etc. La NO synthase neuronale est activée par des acides aminés neuroexcitateurs, tels que l'acide glutamique. La NO synthase macrophagique est induite par les lipopolysaccharides bactériens, l'interféron gamma et l'interleukine 1. Toutes ces NO synthases ont été clonées récemment et partagent une assez grande analogie structurale entre elles, et à un moindre degré — pour leur partie C-terminale — avec le cytochrome P-450 reductase. La NO synthase endothéliale a une action immédiate et produit des picomoles de NO, durant une courte durée. La formation de NO par cette enzyme requiert la présence de 5 cofacteurs : hème, calmoduline, flavine mono- et dinucléotide, tétrahydrobioptérine. La NO synthase macrophagique agit après un délai de quelques heures, correspondant au temps nécessaire à son induction, et produit des nanomoles de NO. La L-arginine qui n'est pas limitante dans le cas de la NO synthase endothéliale peut le devenir dans celui de la NO synthase macrophagique. Toutes ces NO synthases sont inhibées par des analogues de la L-arginine. Il n'existe pas actuellement d'inhibiteurs spécifiques de l'une d'entre elles.

Le tonus vasculaire artériel semble influencé par une libération permanente, constitutive, de monoxyde d'azote qui contribuerait donc au niveau de la pression artérielle basale et aux flux sanguins régionaux. En effet, l'inhibition aiguë de la NO synthase par L-NMMA entraîne une élévation de la pression artérielle chez l'animal. Un nouveau modèle d'hypertension artérielle expérimentale a pu être mis au point par administration chronique de L-NMMA. Une hypertension chronique, dont le niveau dépend de la dose administrée de L-NMMA, est obtenue. Elle est réversible par administration de doses impor-

tantes de L-arginine. Le monoxyde d'azote exercerait un effet vasodilatateur tonique, variable en fonction des territoires vasculaires. Ainsi, le rein semble être particulièrement sensible à l'administration de bloqueurs de la NO synthase. Le monoxyde d'azote antagonise toutes les actions exercées par l'angiotensine II et pourrait ainsi contrebalancer physiologiquement l'effet de ce peptide.

Une question essentielle, non encore résolue, est celle du rôle du monoxyde d'azote en pathologie cardiovasculaire. Il est possible, mais non prouvé, qu'un défaut de production de monoxyde d'azote soit à l'origine de certaines élévations tensionnelles. Ainsi en serait-il du rat génétiquement hypertendu, sensible au sel (rats Dahl), chez qui l'administration de L-arginine abaisse la pression artérielle, peut être en stimulant la production de monoxyde d'azote. Chez l'homme hypertendu, la perfusion d'acétylcholine entraîne une élévation moins importante du débit sanguin de l'avant bras que chez le normotendu. De même, on a montré des anomalies de la vasorelaxation dépendant de l'endothélium sur des artères coronaires athéromateuses. Il est possible que toute destruction de l'endothélium, notamment par l'athérosclérose, entraîne une incapacité à générer correctement du monoxyde d'azote avec pour conséquence une diminution de la vasorelaxation et peut être un effet permissif sur la prolifération cellulaire.

Endothélines

L'endothélium synthétise un peptide vasoconstricteur à action locale, l'endothéline. Cette découverte a été effectuée par Yanagisawa et coll. en 1988. Il existe trois isoformes des endothélines (ET1, ET2 et ET3) mais la cellule endothéliale ne synthétise que l'endothéline 1. Les endothélines sont des peptides de 21 acides aminés cycliques, du fait de la présence de deux ponts disulfure. Il existe une homologie importante de structure, de synthèse et de maturation entre ces trois endothélines. L'endothéline 1 est issue d'un précurseur de 203 acides aminés, la préproendothéline. La big endothéline est maturée à partir de ce précurseur et donne l'endothéline après clivage au niveau d'une liaison tryptophane-valine. Ce clivage s'effectue par une enzyme appelée endothelin converting enzyme (ECE).

L'endothéline 1 exerce un effet vasodilatateur bref, dont l'importance varie en fonction du territoire étudié. Cet effet est suivi d'un effet vasoconstricteur et hypertenseur très puissant et prolongé. Elle exerce une action myocardique inotrope et chronotrope positives, entraînant une vasoconstriction intense des artères coronaires. Ses effets rénaux s'opposent à ceux du monoxyde d'azote : élévation des résistances vasculaires rénales, diminution de la filtration glomérulaire et du flux sanguin rénal, élévation de la réabsorption de sodium. Enfin, l'endothéline exerce un effet mitogénique : stimulation de la proliféra-

tion des cellules musculaires lisses vasculaires et des cellules mésangiales glomérulaires. La régulation de la production d'endothéline est essentiellement transcriptionnelle. De nombreux facteurs comme l'hypoxie, les forces de cisaillement, des hormones comme l'angiotensine II ou la vasopressine, stimulent la transcription du gène de l'endothéline 1.

L'endothéline 1 agit sur un récepteur couplé aux protéines G (récepteur ET_A) situé au niveau des cellules musculaires lisses vasculaires. La stimulation de ce récepteur entraîne une activation de la phospholipase C, une augmentation du calcium intracellulaire et une vasoconstriction. Il existe un deuxième type de récepteur de l'endothéline, ET_B , situé au niveau des cellules endothéliales. Dans les conditions normales, il semble que le taux de ce récepteur soit régulé de façon négative par la production d'endothéline 1 des cellules endothéliales. La stimulation de ce récepteur endothélial par l'endothéline 3, qui a peu d'affinité par le récepteur ET_A , pourrait expliquer l'action vasorelaxante de cette endothéline. En effet, la stimulation du récepteur ET_B endothélial entraîne, par l'intermédiaire de la mobilisation de calcium intracellulaire, une activation de la NO synthase et une production de monoxyde d'azote à effet vasodilatateur.

L'endothéline 1 est un médiateur à effet paracrine (stimulation des cellules musculaires vasculaires) et peut-être autocrine (action sur la cellule endothéliale qui l'a produite). La dualité d'action de l'endothéline 1 — vasorelaxante (et hypotensive) puis vasocontracturante (et hypertensive) — montre bien que le même médiateur peut avoir un effet opposé suivant qu'il exerce son effet sur la cellule endothéliale ou musculaire lisse. L'importance relative de la vasorelaxation ou de la vasoconstriction pourrait dépendre de la balance entre la production d'endothéline et celle du monoxyde d'azote. L'endothéline circule dans le plasma, en faible concentration (pmole/L). Les variations de l'endothéline plasmatique en pathologie vasculaire sont de faible amplitude, mais l'endothéline circulante pourrait n'être qu'un reflet indirect et infidèle des variations tissulaires.

L'importance en physiologie et en pathologie cardiovasculaire de l'endothéline reste encore très hypothétique du fait de l'absence d'inhibiteurs des endothélines. Une recherche active a permis de découvrir récemment des antagonistes des récepteurs des endothélines. Il s'agit de peptides cycliques et linéaires ou de produits naturels non peptidiques. Ces antagonistes inhibent de façon plus spécifique le récepteur ET_A que le récepteur ET_B . Compte-tenu des effets pathologiques supposés de l'endothéline, ils pourraient avoir un effet antihypertenseur chez le rat génétiquement hypertendu, diminuer l'hypertrophie cardiaque secondaire à l'hypertension, lever le vasospasme après hémorragie méningée, diminuer l'hypertension artérielle pulmonaire. Une autre voie de recherche est celle de l'inhibition de l'enzyme de maturation de la big endothéline en endothéline (ECE). Cette enzyme est vraisemblablement

une métallopeptidase, apparemment spécifique, inhibable par le phosphoramidon mais pas par le captopril ou le thiorphan. Ces deux approches devraient permettre de mieux cerner le rôle physio-pathologique de l'endothéline et conduire, éventuellement, à des produits pharmacologiquement intéressants.

Premières tentatives de transfert de gènes et d'oligonucléotides anti-sens dans la paroi artérielle

Du fait du vieillissement, de l'hypertension, de l'hypercholestérolémie, la paroi vasculaire est le siège de modifications pathologiques locales pouvant aboutir à la sténose et à la thrombose. Plusieurs types de traitements médicamenteux (anticoagulants, thrombolytiques, hypocholestérolémiantes), ou la dilatation des artères sténosées sont actuellement proposées en cas de sténose artérielle. Une autre voie d'approche, éventuellement complémentaire, consisterait à modifier le phénotype des cellules de la paroi artérielle grâce à un transfert de gènes ou d'oligonucléotides antisens. Le modèle expérimental le plus étudié est celui de la prolifération néointimale carotidienne qui suit une dénudation endothéliale. On observe après abrasion de l'endothélium de la carotide primitive du rat une prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires, maximale en 48 heures, une production de matrice extracellulaire et une migration des cellules musculaires lisses vasculaires vers l'intima. La prolifération néointimale est maximale en 96 heures et des lésions d'athérosclérose, aboutissant à une sténose carotidienne, surviennent. Ce modèle murin a ses limites puisque le degré de prolifération néointimale est fonction de l'importance du traumatisme des cellules endothéliales et des cellules musculaires lisses vasculaires et qu'il ne semble pas prédictif des résultats thérapeutiques obtenus en inhibant la prolifération néo-intimale chez le porc, le primate et l'homme. Ainsi en est-il des inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine I qui diminuent la prolifération néointimale chez le rat mais sont apparemment dénuées d'effet chez ces dernières espèces. Toutefois, ce modèle a l'avantage d'étudier de façon simple la faisabilité et l'effet du transfert de gènes et d'oligonucléotide antisens dans la paroi artérielle.

La faisabilité du transfert des gènes dans la paroi artérielle a été étudiée depuis peu. Dans une première série d'expériences, des cellules endothéliales autologues en culture primaire ont été transfectées par un vecteur rétroviral contenant le gène de la bêta-galactosidase. Puis ces cellules ont été transférées *in vivo* dans un segment vasculaire dénudé. Un faible pourcentage de cellules transfectées colonise l'endothélium et exprime le gène de la bêta-galactosidase pendant deux à quatre semaines après transfert. La lourdeur de ces expériences, qui impliquent la mise en culture de cellules endothéliales autologues et la sélection des cellules transfectées, a amené à essayer de transférer directement le gène de la β -galactosidase ou de la luciférase *in vivo* dans des artères dénudées et isolées du sang circulant pendant un temps bref. Il est

ainsi possible de transférer dans la paroi artérielle (cellules endothéliales et cellules musculaires lisses vasculaires) des rétrovirus ou des plasmides, et d'obtenir une persistance de l'expression d'un gène reporter pendant quelques semaines. Toutefois les limites actuelles de ces expériences sont la variabilité de l'expression du gène reporter et l'efficacité très faible de la transfection *in vivo* résultant en un niveau minime et variable de l'expression du gène reporter.

Une étude récente montre qu'il pourrait être possible d'administrer des oligonucléotides antisens dans la paroi artérielle afin d'inhiber la prolifération néo-intimale. Simmons et coll. ont administré un oligonucléotide phosphorothiolate anti *C-myb*. Ces auteurs ont observé une inhibition de la prolifération néointimale à l'endroit de l'administration pendant deux semaines. Bien qu'il ne s'agisse que d'une expérience unique pour l'instant, elle ouvre la voie à une thérapie génique ciblée de la paroi artérielle. Cette voie est intéressante dans la mesure où un tiers des patients ayant subi une dilatation des artères coronaires ont une resténose dans l'année qui suit. Aucun traitement médical ne semble pour l'instant permettre d'éviter cette resténose. L'association d'un geste mécanique de dilatation à une thérapie génique ou par oligonucléotide antisens pourrait permettre d'éviter cette resténose. Les conditions requises pour une telle thérapie seraient que cette action soit locale, limitée dans le temps, réversible et rapide. Elle devrait porter sur des cellules prolifératives et non sur les cellules quiescentes et être, bien entendu, dénuée de risque.

P. C.

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. KOTELEVTSSEV, M.C. ZENNARO, E. VILLARD

1 - Biologie moléculaire de l'enzyme de conversion (ECA) Contrôle génétique de la pression artérielle

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. Les travaux ont abouti à la publication d'un mémoire sous presse sur la cartographie des éléments fonctionnels de la transcription en 5' du gène de l'ECA.

— Etude du promoteur de l'ECA germinale. Les résultats que nous avons obtenus sur l'effet transcriptionnel de l'intron 12 dans les cellules tera-1 a été publié et ce sujet est maintenant arrêté. (S. Nadaud).

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

Ce programme est réalisé en collaboration avec John Mullins à Edinburg 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. Actuellement, après de gros problèmes techniques, il semble que trois rats transgéniques aient été obtenus. Dans les mois qui viennent, les travaux vont permettre de confirmer la présence du transgène et son expression (P. Testut, C. Hubert).

c) Effet du polymorphisme du gène de l'ECA sur la concentration d'ECA dans le plasma

Nos travaux ont permis de montrer qu'un allèle du gène de l'ECA (allèle D) était associé à un taux plus élevé d'ECA dans le plasma que celui associé à l'autre allèle (allèle I). Une autre étude a montré que ce polymorphisme n'était pas, par lui-même responsable de l'effet mais qu'il était en déséquilibre de liaison avec un variant non identifié sur le gène. En collaboration avec François Cambien, nous avons montré que l'allèle D est associé à un risque accru d'infarctus du myocarde.

Notre principal projet dans ce domaine est actuellement de déterminer la nature moléculaire du variant du gène de l'ECA responsable de la différence d'expression que nous avons mis en évidence (E. Villard, A.M. Houot).

2 - Gène de l'enzyme endothéliale humaine de synthèse du monoxide d'azote

L'importance de ce gène est majeure pour la physiologie de la pression artérielle. Il s'agit d'une enzyme spécifique de l'endothelium capable de synthétiser un médiateur hautement diffusible qui active la guanylate cyclase soluble de la cellule musculaire lisse et provoque sa relaxation. Nous avons cloné le gène humain dans un cosmide et déterminé la quasi-totalité de sa structure intron-exon. Les projets sont l'étude de la régulation de l'expression de ce gène, la création d'animaux transgéniques avec le gène humain, la caractérisation de marqueurs polymorphes sur ce gène.

3 - Contrôle génétique de la pression artérielle

a) Gènes candidats et hypertension artérielle

Notre travail sur le gène de l'angiotensinogène a montré l'implication de ce gène dans l'hypertension artérielle essentielle par une approche familiale et de type cas-contrôle. Nous avons ainsi trouvé une association entre un marqueur du gène et l'hypertension artérielle. Ces travaux ont été publiés en collaboration avec le groupe de Salt Lake City (J.M. Lalouel et X. Jeunemaître).

Nous développons actuellement des marqueurs sur d'autres gènes candidats, tels que le récepteur de l'angiotensine II et le gène la NO synthase endothéliale (A. Bonnardeaux). Nous avons également déterminé la structure du cDNA du récepteur de l'angiotensine II dans le syndrome de Bartter (F. Soubrier, A. Bonnardeaux, Y. Kotelevtsev, M.C. Zennaro, E. Villard, A.M. Houot).

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

Après l'absence de mise en évidence de mutation sur le récepteur minéralocorticoïde dans cette pathologie, nous avons déterminé la structure du gène et le clonage du promoteur est en cours. Il permettra notamment la poursuite de l'étude du polymorphisme de ce gène dans diverses pathologies. (M.-C. Zennaro, Y. Kotelevtsev).

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

Nous avons montré qu'une élévation familiale de la prorénine pouvait être due à une anomalie de séquence du gène de la rénine. 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 avons testé la fonctionnalité de cette mutation en recréant une mutation identique par mutagenèse *in vitro* du cDNA de la préprorénine et montage dans un vecteur d'expression. Ce vecteur a été transféré dans une lignée cellulaire capable de maturer la prorénine (lignée AtT-20) et nous avons montré que la rénine mutée n'était pas décelée dans le milieu de culture (J.-D. Lalau, E. Villard, A.M. Houot). Nous avons étendu l'observation à plusieurs membres de la famille, montrant la co-ségrégation entre cette mutation et l'élévation anormale de prorénine plasmatique.

II. *ÉTUDE DES RAPPORTS STRUCTURE/FONCTION
DES PROTÉINES DU SYSTÈME RÉNINE-ANGIOTENSINE
ET DES RÉCEPTEURS MEMBRANAIRES DE L'INSULINE
ET DE L'ANGIOTENSINE II*

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

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) *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 a permis de produire un angiotensinogène dont le clivage devrait libérer un antagoniste peptidique de l'angiotensine II. Ces deux mutants vont être prochainement caractérisés *in vitro* en collaboration avec X. Jeunemaitre, avec qui nous développons un projet d'étude sur les caractéristiques fonctionnelles de mutants naturels de l'angiotensinogène. Si les deux mutants précités se révèlent avoir les propriétés fonctionnelles attendues, les séquences d'ADN correspondantes seront introduites dans des ovocytes de rats et les rats transgéniques correspondants seront étudiés.

b) *Le récepteur de l'angiotensine II*

Ayant obtenu la séquence d'ADNc des récepteurs AT1a et AT1b de rat et ayant cloné le gène du récepteur AT1 humain, nous avons entrepris leur caractérisation dans différentes directions.

* Caractérisation fonctionnelle de ces récepteurs : pharmacologie comparée, voies de signalisation intracellulaire (phospholipase C, adénylate cyclase, phospholipases D et A2), mécanisme d'action de l'angiotensine II par l'intermédiaire de ces récepteurs sur la croissance et la division cellulaire, ainsi que sur le métabolisme glucidique (B. Teutsch).

* Analyse moléculaire du site de liaison de l'angiotensine II et des antagonistes non peptidiques par mutation des acides aminés polaires des domaines transmembranaires. La mutation de l'aspartate 74 modifie la spécificité du site

de liaison et bloque le couplage aux protéines G (Proc Natl Acad Sci USA 1993). Une dizaine d'autres mutants sont actuellement caractérisés (C. Monnot et C. Bihoreau). Un ADN synthétique codant pour le récepteur AT1a de rat et possédant un site de restriction unique tous les 20 à 40 nucléotides a été exprimé et le récepteur correspondant caractérisé. Son fonctionnement normal permet son utilisation pour la production rapide de mutants (S. Conchon).

* Production d'anticorps contre le récepteur AT1a de rat : la caractérisation des anticorps anti-peptides s'est révélée décevante. Nous avons donc produit 3 mutants du récepteur possédant une séquence supplémentaire correspondant à un épitope (FLAG) à l'extrémité COOH ou NH₂ terminale de la protéine. Ces récepteurs, parfaitement fonctionnels sont actuellement en cours de caractérisation et de purification avec l'anticorps anti-FLAG. Ceci devrait nous permettre de produire des anticorps contre la protéine purifiée et d'étudier son métabolisme et son internalisation (S. Conchon).

* Variations qualitatives et quantitatives du récepteur AT1 dans la pathologie humaine : recherche de mutations somatiques du récepteur dans les adénomes de Conn et les hyperplasies surrénaliennes. Recherche de mutations du récepteur dans certaines foetopathies, étude de l'expression du récepteur AT1 et de ses variations dans différents états d'hyper ou d'hyporéninisme dans les cellules circulantes chez l'homme par RT-PCR quantitative. Enfin nous avons caractérisé un marqueur polymorphe (CA repeat) situé en 3' du 3^e exon du gène du récepteur AT1 humain, qui va permettre au groupe de F. Soubrier d'étudier une liaison potentielle de ce gène candidat avec l'hypertension artérielle (E. Davies).

c) Récepteur 1 humain de la vasopressine

Avec M. Thibonnier (Associate Professor, Case Western Reserve University, Cleveland OH, USA), nous avons cloné, séquencé, exprimé et caractérisé le récepteur 1 humain de la vasopressine (C. Auzan).

d) Récepteur de l'insuline

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

* Analyse de mutants de glycosylation de la chaîne β du récepteur, 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. Nous avons ainsi montré que l'absence de glycosylation du site de N-glycosylation le plus proche de la membrane plasmique sur la chaîne β du récepteur était essentielle pour la transmission du signal. Nous envisageons d'étudier sa structure et ses interactions moléculaires avec la membrane et les protéines environnantes.

* Etude du rôle du domaine transmembranaire dans la transmission du message hormonal. La suppression de ce domaine ne permet pas de produire un récepteur membranaire fonctionnel. L'inversion de la séquence de ce domaine n'a pas de conséquence sur l'expression et les fonctions du récepteur. D'autres mutants sont en cours d'étude.

* 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. La mutation des 2 séquences spécifiques des tyrosine-kinases et leur remplacement par des séquences spécifiques des sérine-kinases abolit l'activation du récepteur par l'insuline et la transmission des effets insuliniques. Reste à démontrer l'acquisition d'une spécificité sérine-kinase de ces récepteurs mutés.

* Enfin l'expression des ARNm des deux isoformes du récepteur de l'insuline dans le muscle et le tissu adipeux au cours de différents états d'insulino-résistance chez l'homme est actuellement explorée par RT.PCR quantitative.

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

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

Ce groupe a comme thème de recherche l'enzyme de conversion de l'angiotensine I ou ECA. Actuellement deux objectifs majeurs sont poursuivis :

1) L'étude du mécanisme de libération de la forme circulante de l'ECA.

Une protéolyse post-traductionnelle provoque la libération d'une forme soluble active de l'ECA. La forme soluble est isolée à partir du plasma humain ou du milieu de culture de cellules CHO transfectées par le cDNA correspondant à la forme membranaire des cellules endothéliales vasculaires humaines. L'enzyme est ancrée dans la membrane plasmique par l'intermédiaire d'une pièce hydrophobe de 17 aminoacides situés dans la partie C-terminale de la molécule.

La localisation du site de clivage sur l'enchaînement C-terminal de la forme membranaire et l'identification de l'enzyme responsable de la libération de la membrane de l'ECA chez les cellules CHO transfectées est donc notre premier objectif. Dans un second temps nous étudions si ce mécanisme est applicable à la cellule endothéliale humaine.

2) L'étude des différences enzymatiques des deux sites actifs vis-à-vis de substrats particuliers et des inhibiteurs de l'ECA.

L'ECA est une ectoenzyme à zinc qui a la particularité de posséder deux sites catalytiques très homologues l'un situé dans la partie N-terminale de la

molécule, l'autre dans la partie C-terminale. Ces deux sites présentent toutefois des différences : l'activité enzymatique mesurée par la libération de l'acide hyppurique à partir du substrat synthétique Hip-His-Leu est essentiellement due au domaine C-terminal de la protéine. Cette activité est fonction de la concentration en ions chlorure du milieu (optimum : 600 mM) mais cette dépendance est, toutefois modulée suivant la nature du substrat et le pH. L'activité du domaine N-terminal optimum à une concentration de 20 mM en ions chlorure dépend par contre très peu du chlore.

Notre objectif est de trouver si le domaine N-terminal peut avoir des substrats privilégiés et d'autre part si, parmi les nombreux inhibiteurs de l'ECA, certains ne sont pas plus spécifiquement dirigés contre le site enzymatique N-terminal.

a) *Solubilisation de l'ECA endothéliale : localisation du site de clivage protéolytique*

Afin de déterminer la localisation du site de clivage sur la séquence C-terminale de l'ECA endothéliale où se situe la protéolyse responsable de la libération des formes solubles, nous avons déterminé les extrémités C-terminales des formes solubles par des approches biochimiques et immunologiques. Nous avons utilisé une approche de biologie moléculaire : mutagenèse dirigée et biosynthèse pour tenter d'identifier la classe de l'endopeptidase impliquée.

Détermination de l'extrémité C-terminale des ECA solubles

* Approche biochimique

L'ECA sécrétée dans le milieu de culture des cellules de CHO transfectées par le cDNA correspondant à la forme membranaire humaine et la forme circulante, isolée du plasma humain sont préalablement soumises à une purification avant d'être utilisées pour l'identification de leur séquence C-terminale.

Pour ce séquençage C-terminal nous avons choisi une microméthode enzymatique directe par action de deux carboxypeptidases : la carboxypeptidase Y et la carboxypeptidase P. Les résultats obtenus sont confirmés par l'identification du peptide C-terminal obtenu après attaque de la protéine intacte par la protéase du *Staphylococcus aureus*.

Résultats : Nous avons trouvé la même extrémité C-terminale pour l'ECA solubilisée recombinante et pour l'ECA plasmatique, soit la séquence AGQR. Cette séquence est localisée au niveau du résidu d'arginine 1137 de la séquence de l'enzyme membranaire. Ainsi l'identification de l'extrémité C-terminale des formes solubles permet de situer le site de clivage entre l'arginine 1137 et la leucine 1138 de la séquence de l'ECA. Cette libération

protéolytique se traduit par la délétion de 140 aminoacides de l'extrémité C-terminale.

* Immunocaractérisation

Nous avons produit divers anticorps polyclonaux qui sont dirigés contre différents épitopes de la protéine membranaire. Les résultats obtenus avec les protéines membranaires et solubles sont en accord avec un site de clivage entre Arg-1137 et Leu-1138.

b) *Différences enzymatiques des deux sites actifs de l'ECA*

Spécificité de substrat pour le domaine N-terminal

La dégradation du peptide hémorégulateur NAcSer-Asp-Lys-Pro (AcSDKP) qui exerce une régulation négative sur la prolifération des cellules hématopoïétiques semble dans le plasma être due à l'action initiale de l'ECA par libération du dipeptide KP. L'ECA serait ainsi impliquée dans la régulation de l'hématopoïèse. En collaboration avec le groupe de Madame Lenfant (Institut de chimie des substances naturelles. CNRS. Gif-sur-Yvette) nous avons entrepris l'étude de la dégradation de l'AcSDKP, radio marqué par du tritium sur la chaîne latérale du résidu de lysine, par les trois enzymes recombinantes produites par les cellules CHO transfectées par le cDNA de l'ECA membranaire soit normal soit portant des mutations sur les deux histidines du site actif N-terminal ou du site actif C-terminal.

Sensibilité des deux sites actifs vis-à-vis des inhibiteurs

Les trois enzymes recombinants servent aussi à tester une série d'inhibiteurs de l'ECA et permettent de déceler si certains de ces inhibiteurs sont plus spécifiques pour l'un ou l'autre des deux domaines.

IV. RÉGULATION DE L'EXPRESSION DE LA RÉNINE

Equipe : F. PINET, J.M. LE MOULLEC, J. PHILIPPE, S. GERMAIN, N. RIOUAL, T. KONOSHITA, S. FUCHS

a) *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 étudié la synthèse et la sécrétion de rénine en culture primaire de cellules juxtaglomérulaires isolées à partir de rein de souris. Les résultats obtenus nous ont permis de montrer que l'AMP cyclique stimulait la synthèse et la sécrétion de rénine *in vitro* (Della Bruna et al., 1992), et de savoir si l'effet stimulateur de

l'AMP cyclique était dû à une augmentation de l'activité de traduction du mRNA rénine ou dû à une augmentation de l'activité de transcription.

Comme les cellules juxtaglomérulaires de souris ne peuvent être isolées qu'en faible nombre dans le rein et qu'elles ne prolifèrent pas en culture, il était nécessaire d'établir une méthode sensible et fiable qui permette de quantifier les taux de messenger mRNA rénine.

Nous avons mis au point au laboratoire la quantification des ARN messagers par reverse transcription et polymérase chain reaction (RT-PCR). La mesure des mRNA rénine de souris est effectuée directement à partir des cellules juxtaglomérulaires sans extraction des ARN. Un standard interne est ajouté à chaque réaction de reverse transcription et de PCR avec les extraits de cellules juxtaglomérulaires pour vérifier que l'identification et l'efficacité d'amplification soient identiques dans tous les échantillons.

La forskoline stimule de manière dose-dépendante le taux de messenger rénine après 20 heures d'incubation avec un ED_{50} à 3×10^{-7} M. Cet effet est mimé par l'isoprotérénol et l'IBMX. Grâce à cette technique sensible, nous avons pu étudier l'augmentation du messenger rénine par la forskoline et l'isoprotérénol en fonction du temps. Dès une heure, le messenger rénine est stimulé par les deux agents. Contrairement à l'isoprotérénol, pour lequel la stimulation est constante entre 1 heure et 20 heures d'incubation, la forskoline semble produire une stimulation biphasique du messenger rénine. Un niveau équivalent de stimulation a été obtenu au niveau de la sécrétion aussi bien avec la forskoline qu'avec l'isoprotérénol.

Ces résultats nous ont permis de montrer que la PCR quantitative est une technique fiable pour étudier l'expression du gène en culture primaire de cellules juxtaglomérulaires (R. Della Bruna, F. Pinet).

b) *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. Dans une première série d'expériences, nous avons étudié en parallèle la production de rénine, la présence du mRNA rénine sur les cellules chorioniques et sur la lignée établie de cellules JEG.3 (Burt et al., 1989 ; Smith et al., 1991). Les cellules chorioniques sont un meilleur modèle pour étudier la régulation du gène de la rénine : elles produisent de la rénine, contrairement aux cellules JEG.3 ; le mRNA rénine détecté par PCR dans ces cellules représente 5 % du signal obtenu avec les cellules chorioniques précisément les régions importantes du promoteur intervenant dans l'expression du gène de la rénine, une analyse par

délétion de la région 5' a été entreprise. Ces expériences ont montré que les 153 premières paires de bases du promoteur étaient suffisantes pour diriger l'expression du gène de la rénine. Des délétions progressives jusqu'à - 269 paires de bases n'ont pratiquement pas d'effet sur l'activité du promoteur. Par contre, les délétions suivantes révèlent la présence d'un élément cis inhibiteur entre - 269 et - 137 paires de bases.

Pour déterminer précisément les séquences intervenant dans cette expression et par conséquent les protéines nucléaires (facteurs de transcription) régulant l'expression du gène de la rénine, les techniques de préparation d'extraits nucléaires à partir de culture de cellules chorioniques, de protection à la DNase I et de gel retard ont été mises au point dans le laboratoire.

L'étude de la région - 380 à + 16 paires de bases du promoteur de la rénine par protection à la DNase I nous a permis de montrer que les extraits nucléaires des cellules chorioniques se liaient à plusieurs séquences. Par analyse, quatre facteurs ont pu être déterminés, les deux autres ne semblent correspondre à aucune séquence consensus publiées à l'heure actuelle. Les empreintes identifiées partagent des homologies avec les protéines suivantes : ARP-1 (- 259/- 245) : facteur de régulation inhibiteur du gène de l'ApoAI (membre de la superfamille des récepteurs aux stéroïdes), ets (- 29/- 6) : activateur de transcription, Pit-1 (- 79/- 62) (membre de la famille des facteurs de transcription POU) et CRE (- 234/- 214) (cyclic AMP responsive element). Des expériences de gel retard sur cette dernière région (- 234/- 200) nous ont permis de mettre en évidence des complexes ADN-protéines. Pour confirmer ces résultats (empreinte et gel retard) nous avons déterminé la fonctionnalité du CRE rénine par l'activité luciférase des différents mutants de la région 5' du promoteur dans les cellules chorioniques traitées à la forskoline. Les 273 premières paires de bases du promoteur sont suffisantes pour obtenir une stimulation par la forskoline de trois fois. Des délétions jusqu'à - 130 (délétion du CRE) diminue et jusqu'à - 67 (délétion du CRE et Pit 1) supprime la réponse à l'AMP cyclique. Ces résultats laissent supposer que le facteur CRE et le facteur Pit 1 agissent de concert pour avoir une réponse à l'AMP cyclique complète.

c) *Expression des protéases de type Kex2, PCI et PCI/PC3 dans les phéochromocytomes humains*

Ayant à notre disposition différents tissus surrenaliens humains d'origine normale (n = 7) et tumorale (n = 48), nous avons étudié par Northern Blot, la présence des messagers codant pour PC2, PC1/PC3 et de leur substrat possible, la proenképhaline. L'expression de ces gènes n'a pu être détectée que dans les phéochromocytomes. PC2, PC1/PC3 et la proenképhaline étaient exprimés respectivement dans 85, 50 et 90 % des vingt phéochromocytomes étudiés. De plus, la proenképhaline est exprimée seulement dans les phéo-

chromocytomes qui expriment PC2 ou PC1/PC3. La présence de PC2 dans ce tissu et pas d'une autre prohormone convertase « like » a été confirmé : par séquençage direct de produit de PCR obtenu en utilisant des amorces dégénérées de la famille des convertases et par hybridation *in situ*.

Par étude enzymatique, en utilisant des substrats synthétiques fluorogéniques, nous avons étudié la spécificité des activités enzymatiques des protéines membranaires extraites des phéochromocytomes. Ces activités enzymatiques clivent préférentiellement du côté carboxyl du résidu arginine d'un couple dibasique avec une dépendance vis-à-vis du calcium et un pH optimum à 7,5. Ces résultats démontrent qu'une endoprotéase de type Kex2 est exprimée dans les phéochromocytomes humains qui pourrait être impliquée dans le processing de la proenképhaline dans ces tissus (T. Konoshita, F. Pinet).

d) *Expression des messagers codant pour l'ocytocine et la vasopressine dans l'hypothalamus de rat par PCR quantitative*

L'agoniste Kappa (RU51599) a une activité aquarétique aussi bien chez le rat que chez l'homme. Cette activité aquarétique est caractérisée par une diurèse aqueuse sans excrétion d'électrolytes. Cet agoniste semble agir par une suppression de la libération de vasopressine. Nous avons décidé d'étudier la régulation du gène de la vasopressine en réponse à l'activation des récepteurs Kappa par le RU51599 au niveau de l'hypothalamus. La quantification des messagers codant pour la vasopressine (AVP) et l'ocytocine (OT) a été mise au point au laboratoire. Ayant décidé d'étudier en parallèle l'AVP et l'OT, une PCR compétitive a été mise au point avec l'utilisation du même standard interne pour les deux messagers. L'ocytocine sert de contrôle puisque les taux ne varient pas dans les conditions expérimentales utilisées. Il a été montré qu'une déprivation en eau stimulait les taux de messagers AVP. Par PCR quantitative, nous avons confirmé ces résultats (stimulation de 5 fois du message) alors que les taux d'OT restent stables (J. Le Moullec, F. Pinet).

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

Equipe : J.M. GASC, F. MONGIAT, M. SIBONY, M.T. MORIN, S. SHANMUGAM

a) *Expression du récepteur ATI de l'angiotensine II*

Détection de l'ARN messageur par hybridation in situ

L'interaction de l'angiotensine II avec son récepteur de type I, situé à la membrane plasmique des cellules cibles, déclenche une cascade de réactions

intracellulaires mettant en jeu le métabolisme des inositol phosphates. Le récent clonage et séquençage de l'ADNc du récepteur AT1 a permis de commencer une étude par Hybridation *in situ* de l'expression de son ARNm chez le rat adulte et au cours de la période périnatale. Chez le rat il existe deux gènes codant pour deux sous-types de récepteurs de l'angiotensine II : AT1a et AT1b. Leurs séquences codantes sont presque identiques, mais les parties non codantes en 5' et 3' de leur ADNc sont assez différentes. Ces différences ont été utilisées pour préparer deux sondes de RNAc spécifiques l'une de l'AT1a et l'autre de l'AT1b, utilisées en hybridation *in situ*.

Chez le rat adulte l'ARNm du récepteur AT1 est détecté dans le rein, la glande surrénale, le foie, le poumon et l'hypophyse. Le sous-type AT1a est majoritaire dans le rein, la medullosurrénale, le foie et le poumon, le sous-type AT1b dans la zone glomérulée de la surrénale et dans l'hypophyse. Dans le rein un fort niveau d'expression a été observé dans les cellules juxtaglomérulaires sécrétant la rénine, dans les cellules mésangiales, dans les parois des vasa recta et dans quelques cellules interstitielles du cortex. La présence d'ARNm du récepteur AT1 dans les cellules juxtaglomérulaires confirme l'hypothèse d'un rétro-contrôle direct de l'angiotensine II sur la sécrétion de rénine.

Des études provenant de plusieurs laboratoires avaient montré la présence de nombreux sites de liaison pour l'angiotensine II dans le fœtus de rat en fin de gestation. Les caractères pharmacologiques permettaient d'attribuer cette liaison au récepteur de type 2 (AT2) dont les voies de transmission du signal et les fonctions sont encore inconnues, contrairement à celles de l'AT1. Une étude par hybridation *in situ* a été entreprise pour savoir si, en plus du récepteur AT2, le fœtus de rat exprime aussi l'AT1.

Les récepteurs AT1, détectés par leur ARNm, sont déjà présents dans le fœtus à 13 jours de gestation. A 19 jours de vie foetale, les récepteurs AT1 sont détectés dans la glande surrénale (zone glomérulée), le rein (mesangium en formation et mésenchyme cortical), les poumons, le foie, le cœur, l'hypophyse et un ensemble de mésenchymes spécialisés et bien caractérisés : perivasculaire, perichondrial et subépidermique. Cette expression du récepteur AT1 est à mettre en rapport avec les propriétés spécifiques des mésenchymes foetaux, différentes suivant leur localisation et leur association avec d'autres tissus ou organes. On peut donc penser à un rôle de l'angiotensine II comme facteur de croissance ou de différenciation en plus de ses effets sur l'équilibre hydrominéral.

A partir du travail sur l'ontogénèse des récepteurs AT1 pendant la période pré- et peri-natale l'étude des rôles de l'angiotensine II, et en particulier ses implications dans la croissance et la différenciation des cellules cibles, sera abordée. De même, la régulation des deux sous-types pendant cette période sera examinée pour mieux cerner leur signification physiologique.

b) *Enzyme de conversion de l'angiotensine*

Etude ultrastructurale dans les cellules transfectées

L'enzyme de conversion de l'Angiotensine I (ECA) est située à la membrane plasmique des cellules endothéliales, et à la bordure en brosse de certains epitheliums. Ses deux sites catalytiques et son extrémité N-terminale sont extracellulaires.

L'objectif original de ce travail était de vérifier cette orientation sur les membranes des différents compartiments cellulaires. Les cellules germinales mâles qui expriment une isoforme tronquée de l'enzyme avaient semblé constituer un système intéressant dans ce but, puisque l'enzyme y est présente au cours de leur différenciation d'abord dans l'appareil de golgi, puis dans le cytoplasme, puis à la membrane plasmique des spermatides et des spermatozoïdes. Pour des raisons non élucidées cette étude n'a pas été possible faute d'immunoréactivité dans les cellules germinales préparées pour la microscopie électronique. C'est pourquoi nous avons utilisé la lignée de cellules CHO transfectées de façon stable avec l'ADNc de l'ECA. Lorsque l'ADNc transfecté est celui de l'enzyme sauvage, on retrouve bien l'enzyme à la membrane avec son orientation vers l'extérieur de la cellule. Il n'y a aucune trace d'enzyme dans le cytoplasme, ce qui indique un transit intracytoplasmique très rapide. Le devenir de l'enzyme en présence de substrat, ou d'analogues agonistes ou antagonistes est en cours d'examen.

VI. *EXPRESSION DES ECTOENZYMES À ZINC
ET DU RÉCEPTEUR DE L'ANGIOTENSINE II DANS DIFFÉRENTES
SITUATIONS PHYSIOPATHOLOGIQUES*

Equipe : C. LLORENS-CORTES, H. HUANG, B. GREENBERG

a) *Rôle des ectoenzymes à zinc [endopeptidase neutre (NEP), enzyme de conversion (ACE), aminopeptidase A (APA)] dans le métabolisme des peptides vasoactifs et leur modification d'expression dans certaines conditions physiopathologiques*

1 - *Identification et caractérisation de l'endopeptidase neutre dans les cellules endothéliales d'origine artérielle ou veineuse*

L'endopeptidase neutre (EC 3.4.24.11) est une glycoprotéine transmembranaire de 90 kDa appartenant à la famille des métalloprotéases à zinc de classe III. C'est une enzyme qui peut agir comme une dipeptidyl carboxypeptidase ou comme une endopeptidase.

Elle hydrolyse l'ANP, un peptide vasodilatateur qui joue un rôle dans la régulation physiologique de la pression artérielle et de l'homéostasie des

fluides et des électrolytes. L'hydrolyse a lieu au niveau de la liaison Cys105-Phe106 avec ouverture du cycle produisant un fragment dépourvu d'activité biologique.

Le lieu d'action le plus probable de ces inhibiteurs semblerait être le rein, organe le plus riche en activité NEP. Cependant, certaines expériences réalisées chez des rats binéphrectomisés, suggèrent une autre possibilité. En effet, la néphrectomie bilatérale chez le rat n'empêche pas la dégradation de l'ANP, de même le SCH 39370, inhibiteur de la NEP, réduit toujours la dégradation de l'ANP exogène. Ces résultats suggèraient un lieu d'action extrarénal pour ces inhibiteurs. Nous avons émis l'hypothèse que ces inhibiteurs pourraient agir sur la NEP située sur l'endothélium.

Nous avons vérifié cette hypothèse en identifiant et caractérisant la NEP dans les cellules endothéliales d'origine artérielle ou veineuse dans plusieurs espèces (humaine, bovine, porcine) par trois approches différentes : 1 - caractérisation enzymatique ; 2 - visualisation par immunofluorescence à l'aide d'un anticorps monoclonal dirigé contre la NEP rénale de lapin ; 3 - détection de transcrits spécifiques de la NEP.

La démonstration de l'existence de la NEP dans les cellules endothéliales, localisation similaire à celle de l'ECA qui y est stratégiquement localisée pour métaboliser l'angiotensine II et la BK circulantes, a ouvert une nouvelle voie pour l'interprétation du métabolisme global *in vivo* des peptides vasoactifs circulants tels que l'ANP, la BK et l'endothéline. La NEP endothéliale doit donc vraisemblablement jouer un rôle dans la régulation de la concentration de ces peptides dans certaines conditions physiologiques ou pathologiques. L'augmentation des taux d'ANP plasmatique dans certaines pathologies comme l'insuffisance cardiaque ainsi que dans certaines hypertensions associées à une expansion volémique, conduisent à envisager l'intérêt thérapeutique des inhibiteurs de la NEP dans ces pathologies.

2 - Expression de plusieurs ectoenzymes à zinc (NEP, ECA, APA) chez le rat atteint d'insuffisance cardiaque congestive

L'ECA, l'APA et la NEP sont des enzymes clés, localisées au niveau des cellules endothéliales ou épithéliales, impliquées dans le métabolisme des peptides vasoactifs du système rénine-angiotensine et du système natriurétique cardiaque.

Le but de ce travail a été d'étudier la fonction endothéliale au cours de l'insuffisance cardiaque congestive (ICC) en recherchant dans le poumon des modifications d'expression de deux ectoenzymes typiquement endothéliales comme l'ECA et l'APA, et en cherchant si la réponse natriurétique rénale atténuée, dans cette pathologie, pourrait être due à une augmentation de la dégradation de l'ANP par la NEP.

Nous avons pu mettre en évidence une baisse très significative de l'activité de l'ACE pulmonaire ainsi qu'une augmentation de l'ACE plasmatique proportionnelles dans un modèle d'insuffisance cardiaque expérimentale créée par infarctus du myocarde (ligature de la coronaire).

Le changement de l'activité de l'ECA pulmonaire est particulier à cet organe puisque l'activité de l'ECA rénale n'est pas modifiée. Ceci suggère une régulation cellulaire spécifique, étant donné que l'activité de l'ECA pulmonaire reflète principalement l'ECA endothéliale tandis que l'activité de l'ECA rénale reflète celle de l'ECA épithéliale. Le fait qu'il n'y ait pas de modification de l'activité de l'APA dans le poumon, une autre ectoenzyme endothéliale, suggère que le changement de l'activité de l'ECA est non seulement spécifique pour l'organe et les cellules mais aussi pour le type d'ectoenzyme. La diminution de l'activité de l'ECA pulmonaire est due probablement à une diminution de la synthèse de cette enzyme dans les cellules endothéliales puisque la diminution de l'activité de l'ECA pulmonaire est associée à une baisse des taux d'ARN messager codant pour cette enzyme. L'ensemble de ces résultats, c'est-à-dire la diminution de l'activité de l'ECA pulmonaire ainsi que l'augmentation concomitante de l'activité de l'ECA plasmatique au cours de l'ICC révèle une modification fonctionnelle inédite du SRA aussi bien qu'un nouvel aspect du dysfonctionnement endothélial dans cette pathologie.

b) Récepteurs de l'angiotensine II : Etude de leur expression au cours de différentes conditions physiopathologiques

Le clonage du gène codant pour le récepteur de l'angiotensine II (AT1) chez le rat et la souris a permis de mettre en évidence deux sous-types AT1a et AT1b. Bien qu'il existe une très grande homologie dans la partie codante, ne permettant pas de les différencier par des expériences de liaison classique, les parties non codantes en 3' et 5' sont très différentes. Nous avons développé une RT-PCR quantitative. La quantification de ces réactions est possible si l'on ajoute à l'ARN sauvage, un ARN synthétique (en trace) qui va subir les mêmes opérations permettant de suivre le rendement de chacune des réactions et d'établir une courbe étalon. Cet ARN synthétique doit être très proche de la séquence à amplifier. Dans notre cas, il correspond à un mutant de l'ADNc du récepteur AT1a où 60 bp ont été délétés (notamment le site EcoRI).

Ayant mis au point ces conditions, nous avons pu estimer le nombre de copies de chacun de ces messagers dans différents organes. Certains d'entre eux contiennent en majorité le messager du récepteur AT1a comme le foie, le poumon, le rein, l'aorte, ainsi que certains noyaux cérébraux comme le noyau paraventriculaire ou le noyau arqué. D'autres, comme l'hypophyse ou les surrénales, sont très riches en messager du récepteur AT1b. Nous avons validé cette approche en étudiant chez le rat les effets d'un régime désodé,

connu pour activer le système rénine-angiotensine, et modifier de façon opposée le nombre des sites de liaison de l'angiotensine II (AT1) dans l'aorte et les surrénales. Nous avons observé des variations similaires pour les messagers de ces récepteurs (diminution des ARNm du récepteur AT1a dans l'aorte, augmentation des ARNm du récepteur AT1b dans les surrénales).

Nous commençons à étudier l'expression des gènes codants pour les récepteurs AT1a et AT1b dans différents modèles d'hypertension (génétique ou provoqué) dans différentes conditions pharmacologiques (traitement chronique à l'angiotensine II, au DUP753, aux œstrogènes). Ces études nous permettront de définir comment ces deux sous-types sont respectivement régulés et dans quelles fonctions physiologiques ils sont impliqués.

BIBLIOGRAPHIE

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 cultured mouse renal juxtaglomerular cells. *Am. J. Physiol.*, 262 : F397-F402, 1992.

RACZ K., PINET F., GUYENE T.T. and CORVOL P. Coexpression of renin, angiotensinogen and their messenger ribonucleic acids in adrenal tissues. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 75 : 730-737, 1992.

LLORENS-CORTES C., HUANG H., VICART P., GASC J.M., PAULIN D. and CORVOL P. Identification and characterization of neutral endopeptidase in endothelial cells from venous and arterial origins. *J. Biol. Chem.*, 267 : 14012-14018, 1992.

WEI L., CLAUSER E., ALHENC-GELAS F. and CORVOL P. The two homologous domains of human angiotensin I-converting enzyme interact differently with competitive inhibitors. *J. Biol. Chem.*, 267 : 13398-13405, 1992.

TIRET L., RIGAT B., VISVIKIS S., BREDA C., CORVOL P., CAMBIEN F. and SOUBRIER F. Evidence, from combined segregation and linkage analysis, that a variant of the angiotensin I-converting enzyme (ACE) gene controls plasma ACE levels. *Am. J. Hum. Genet.*, 51 : 197-205, 1992.

LECONTE I., AUZAN C., DEBANT A., ROSSI B. and CLAUSER E. N-linked oligosaccharide chains of the insulin receptor β subunit are essential for transmembrane signaling. *J. Biol. Chem.*, 267 : 17415-17423, 1992.

TEUTSCH B., BIHOREAU C., MONNOT C., BERNSTEIN K.E., MURPHY T.J., ALEXANDER R.W., CORVOL P. and CLAUSER E. A recombinant rat vascular AT1 receptor confers growth properties to angiotensin II in chinese hamster ovary cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 187 : 1381-1388, 1992.

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, 1992.

ZENNARO M.C., BORENSZTEIN P., SOUBRIER F., ARMININI D. and CORVOL P. Pseudohypoaldosteronism : a case survey and future directions. *Cellular and Molecular Biology of the Adrenal Cortex*, Eds J.M. Saez, A.C. Brownie, A. Capponi, A.M. Chambaz, F. Mantero, Colloque INSERM/John Libbey Eurotext Vol. 222 : pp. 205-214, 1992.

PINET F., RACZ K., GASC J.M., GUYENE T.T. and CORVOL P. Local adrenal renin-angiotensin system. *Cellular and Molecular Biology of the Adrenal Cortex*, Eds J.M. Saez, A.C. Brownie, A. Capponi, A.M. Chambaz, F. Mantero, Colloque INSERM/John Libbey Eurotext Vol. 222 : pp. 283-292, 1992.

PHAM I., EL AMRANI A.I.K, FOURNIE-ZALUSN M.C., CORVOL P., ROQUES B. and MICHEL J.B. Effects of the selective neutral endopeptidase inhibitor, retrothiorphan, on renal function and blood pressure in conscious normotensive Wistar and hypertensive DOCA-salt rats. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 20 : 847-857, 1992.

NADAUD S., HOUOT A.M., HUBERT C., CORVOL P. and SOUBRIER F. Functional study of the germinal angiotensin I-converting enzyme promoter. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 189 : 134-140, 1992.

ITSKOVITZ J., BRUNEVAL P., SOUBRIER F., THALER I., CORVOL P. and SEALEY J.E. Localization of renin gene expression to monkey ovarian theca cells by *in situ* hybridization. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 75 : 1374-1380, 1992.

CORVOL P., JEUNEMAITRE X., CHARRU A., SOUBRIER F. Can the genetic factors influence the treatment of systemic hypertension ? The case of the renin angiotensin aldosterone system. *Am. J. Cardiol.*, 70 : D14-D20, 1992.

CAMBIEN F., POIRIER O., LECERF L., EVANS A., CAMBOU J.P., ARVEILER D., LUC G., BARD J.M., BARA L., RICARD S., TIRET L., AMOUEYEL P., ALHENC-GELAS F. and SOUBRIER F. Deletion polymorphism in the gene for angiotensin-converting enzyme is a potent risk factor for myocardial infarction. *Nature*, 359 : 641-644, 1992.

JEUNEMAITRE X., SOUBRIER F., KOTELEVTSYEV Y., LIFTON R.P., WILLIAMS C.S., CHARRU A., HUNT S.C., HOPKINS P.N., WILLIAMS R.R., LALOUEL J.M. and CORVOL P. Molecular basis of human hypertension : Role of angiotensinogen. *Cell*, 71 : 169-180, 1992.

SIMON D., HARTMANN D.J., BADOUAILLE G., CAILLOT G., GUYENE T.T., CORVOL P., PAU B. and MARCHAND J. Two-site direct immunoassay specific for active renin. *Clin. Chem.*, 38 : 1959-1962, 1992.

CLAUSER E., LECONTE I. and AUZAN C. Molecular basis of insulin resistance. *Horm. Res.*, 38 : 5-12, 1992.

CHAUVEAU D., GUYENE T.T., CUMIN F., CHATELLIER G., CORVOL P. and MENARD J. Investigation of the biochemical effects of renin inhibition in normal volunteers treated by an ACE Inhibitor. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 33 : 253-260, 1992.

1993

SIBONY M., GASC J.M., SOUBRIER F., ALHENC-GELAS F. and CORVOL P. Gene expression and tissue localization of the two isoforms of angiotensin I-converting enzyme. *Hypertension*, 21 : 827-835, 1993.

GASC J.M., MONNOT C., CLAUSER E. and CORVOL P. Coexpression of type 1 angiotensin II receptor (AT1R) and renin mRNAs in juxtaglomerular cells of the rat kidney. *Endocrinology*, 132 : 2723-2725, 1993.

HARRAP S.B., DAVIDSON H.R., CONNOR J.M., SOUBRIER F., CORVOL P., FRASER R., FOY C.J.W. and WATT G.C.M. The angiotensin I-converting enzyme gene and predisposition to high blood pressure. *Hypertension*, 21 : 455-460, 1993.

JASPARD E., WEI L. and ALHENC-GELAS F. Difference in the properties and enzymatic specificities of the 2 active sites of angiotensin I-converting enzyme (kininase II). Studies with bradykinin and other natural peptides. *J. Biol. Chem.*, 268 : 9496-9503, 1993.

KLEMM S., PINET F., RIOUAL-CAROFF N., TUNNY T., CORVOL P. and GORDON R. Detection of renin mRNA in aldosterone-producing adenomas by polymerase chain reaction. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 20 : 303-305, 1993.

SOUBRIER F., HUBART C., TESTUT P., NADAUD S., ALHENC-GELAS F. and CORVOL P. Molecular biology of the angiotensin I-converting enzyme : I. Biochemistry and structure of the gene. *J. Hypertension*, 11 : 471-476, 1993.

SOUBRIER F., WEI L., HUBERT C., CLAUSER E., ALHENC-GELAS F. and CORVOL P. Molecular biology of the angiotensin I-converting enzyme : II. Structure-function. Gene polymorphism and clinical implications. *J. Hypertension*, 11 : 599-604, 1993.

EXPOSÉS, CONGRÈS

Monsieur Pierre Corvol a participé aux meeting suivants : Angiotensin Gordon Research Conference (Chairman) (février 93) ; British Biochemical Society (mars 93) ; International Society of Hypertension/WHO Conference (mars 93) ; British Endocrine Society (avril 93) ; International Society of Nephrology (juin 93).

Monsieur Eric Clauser a participé aux colloques et symposium suivants : Xth International Congress of Endocrinology, Nice (septembre 92) ; 46th Annual Conference of the Council for High Blood Pressure Research, Cleveland, USA (octobre 92) ; Meeting of the American Diabetes Association, Las Vegas, USA (juin 93).

Monsieur Florent Soubrier a participé aux colloques et symposium suivants : Molecular Genetics of Hypertension, Cleveland (septembre 92) ; Société Québécoise d'Hypertension, Montréal (janvier 93) ; Gordon Conference on Angiotensin (février 93) ; Génétique Moléculaire du Diabète, Château des Maffliers (mars 93) ; Société Européenne d'Hypertension, Milan (juin 93) ; Juvenile Hypertension, Londres (juin 93).

Mademoiselle Florence Pinet a participé aux colloques et symposium suivants : 66th Japanese Endocrine Society - Kanazawa (June 1993) ; 75th Annual Meeting of the Endocrine Society (June 9-12,1993).

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. Rossignol - Paris XI) ; Maîtrise de Biochimie (Paris XI) ; DEA de Pharmacologie (Strasbourg).

LISTE DES DIPLÔMÉS

1991-1992

DEA

Stéphane GERMAIN - DEA de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire - Paris IV.

Sadoutounissa SHANMUGAN - DEA d'Endocrinologie et Interactions Cellulaires - Paris VII.

Thèses

Huaming HUANG : « *Variation du taux de l'angiotensin II et rôle des extoenzymes à zinc dans le métabolisme des peptides vasoactifs au cours de différentes conditions physiopathologiques* ». 25 novembre 1992.