

## Médecine expérimentale

M. Pierre CORVOL, professeur

Le cours de Médecine Expérimentale a porté cette année sur les modifications post-traductionnelles des précurseurs hormonaux et des neuropeptides. La plupart des protéines sont synthétisées sous la forme de précurseurs qui subissent des maturations après leur traduction. Un peptide signal, situé à l'extrémité N-terminale de la protéine, permet la translocation de la chaîne naissante de la protéine du ribosome au réticulum endoplasmique et est clivé rapidement par une peptidase. Les hormones peptidiques, les neuropeptides, certains facteurs de croissance et leurs récepteurs, plusieurs protéines plasmatiques (albumine, protéines de la coagulation), certaines interleukines, subissent une maturation supplémentaire complexe à partir de leurs précurseurs.

La première démonstration d'une maturation d'une prohormone en hormone a été fournie par D. Steiner dans le cas de la maturation de la proinsuline en insuline. L'incubation de cellules provenant d'un insulinome pancréatique avec des acides aminés radioactifs a permis de suivre la maturation post-traductionnelle de la proinsuline en insuline : une réduction du poids moléculaire marque cette maturation du fait du clivage du peptide de liaison. Il est rapidement apparu que la plupart des hormones peptidiques étaient produites à partir d'une protéolyse sélective d'un précurseur inactif et de poids moléculaire supérieur à celui de l'hormone. Le site de clivage est le plus souvent un doublet d'acides aminés basiques, le plus fréquemment Lys-Arg, parfois un seul acide aminé basique. Ces acides aminés basiques sont ensuite séquentiellement excisés par une carboxypeptidase. D'autres modifications post-traductionnelles des précurseurs hormonaux et des neuropeptides sont fréquemment rencontrées : amidation du C-terminal de nombreux neuropeptides, acétylation ou pyroglutamination du N-terminal, glycosylation, sulfatation, gamma-carboxylation, phosphorylation.

Ces événements de maturation post-traductionnelle s'effectuent dans des compartiments cellulaires bien précis. Au niveau de la citerne du réticulum

endoplasmique rugueux ont lieu la formation des ponts disulfures et la N-glycosylation. Le *cis* Golgi est le siège de d'*O*-glycosylation, de phosphorylation et de sulfatation tandis que dans le *trans* Golgi s'effectuent les phénomènes d'endo- et d'exoprotéolyse, d' $\alpha$ -amidation. La maturation terminale des précurseurs hormonaux a lieu dans des granules de sécrétion dont le pH est relativement acide par rapport à celui de l'appareil de Golgi : endo- et exoprotéolyse, acétylation.

Le rôle des précurseurs peptidiques et protéiques est encore mal connu. Certains précurseurs protéiques favorisent le repliement correct de la protéine terminale, permettant, le cas échéant, l'assemblage des ponts disulfures. Certaines séquences de pro-peptides pourraient jouer un rôle dans le ciblage du précurseur vers des organelles intracellulaires. Une autre possibilité est la synthèse coordonnée de plusieurs peptides actifs à partir d'un seul précurseur polypeptidique. C'est le cas de la pro-opiomélanocorticotropine (POMC) qui est à l'origine de l'ACTH, de la LPH et de la MSH. Dans ce cas, plusieurs enzymes distincts peuvent cliver différents peptides à partir du même précurseur ; la spécificité de la production des hormones provient alors du type d'enzyme de maturation exprimée dans les cellules synthétisant le précurseur polyhormonal.

Les découvertes les plus récentes proviennent de l'identification et de la caractérisation des principaux enzymes de clivage des précurseurs des hormones et des neuropeptides. Leur rôle a été définitivement établi dans des systèmes simples comme celui de la levure.

*Système enzymatique de maturation du facteur d'accouplement de la levure : mise en évidence de l'endoprotéase Kex2*

La reproduction chez la levure nécessite la maturation d'une phéromone, le facteur  $\alpha$ , par une série d'enzymes. Ce précurseur du facteur  $\alpha$ , le profacteur alpha, comporte 4 copies en tandem du facteur  $\alpha$ . Une paire d'acides aminés basiques, Lys-Arg, sépare chaque copie du facteur  $\alpha$ . La mutation Kex2 entraîne une stérilité chez la levure par absence de maturation du profacteur  $\alpha$ . La reproduction est rétablie par complémentation avec le gène Kex2. La maturation des phéromones fait intervenir une enzyme qui clive le profacteur alpha après un doublet d'acides aminés basiques Lys-Arg. Le produit du gène Kex2 cloné à partir de la levure est une enzyme qui possède une homologie importante au niveau de son domaine catalytique avec celui de la subtilisine bactérienne : l'aspartate, l'histidine et la sérine du site catalytique de la subtilisine sont conservés dans Kex2 ainsi qu'une asparagine qui joue un rôle important dans la liaison du substrat dans le site actif.

L'enzyme Kex2 est une métalloendoprotéase inactivée par l'EDTA, et a un pH optimum de 7.0-7.5, correspondant au pH de l'appareil de Golgi où elle agit. Elle possède un domaine transmembranaire dans sa région C-terminale qui fixe l'enzyme dans la membrane du Golgi, le site catalytique étant situé à l'intérieur de l'appareil de Golgi. La Kex2 clive préférentiellement les substrats synthétiques comportant un doublet basique Lys-Arg ; elle est capable d'hydrolyser des précurseurs hormonaux ou protéiques tels la proinsuline en insuline, la proalbumine en albumine et de cliver la POMC en plusieurs peptides lorsqu'elle est exprimée dans des lignées cellulaires d'origine hypophysaire telles que les AtT20 et les GH4C1.

#### *Découverte de la furine et des prohormones convertases PC1/PC3*

La découverte de la Kex2 de la levure a permis rapidement le clonage de la furine et des prohormones convertases (PC) de mammifère PC1/PC3, PC2, PC4, PC5 et PC6. Leur clonage a reposé sur la similarité de séquences conservées au niveau du site catalytique et leur expression préférentielle dans certaines cellules endocrines ou neuroendocrines. Leur fonction a été étudiée par expression des protéines recombinantes dans deux types schématiques de lignées cellulaires : 1) des lignées cellulaires synthétisant un précurseur hormonal mais pratiquement dépourvues de proconvertases. L'effet de la proconvertase recombinante transfectée dans ces cellules est étudié sur la maturation du précurseur hormonal, protéique ou neuropeptidique, présent naturellement ou cotransfecté dans la cellule hôte ; 2) des cellules ne synthétisant pas de prohormones endogènes et ne possédant qu'une voie constitutive.

Les critères nécessaires pour affirmer qu'une enzyme de maturation ainsi caractérisée correspond à l'enzyme naturelle responsable de la conversion d'une prohormone en hormone sont : 1°) Identité de maturation *in vitro* des précurseurs aux produits finaux observés *in vivo* ; 2°) Identité de spécificité, d'activation et d'inhibition des enzymes recombinantes et présentes naturellement ; 3°) Localisation sub-cellulaire correspondant à celle attendue du rôle de la convertase ; 4°) Co-localisation de l'enzyme et du substrat.

Ces critères ne sont pleinement réunis que dans le cas du système de la maturation du profacteur  $\alpha$  de la levure où un critère supplémentaire et définitif est apporté par l'inactivation du gène Kex2 qui provoque l'absence de maturation du profacteur  $\alpha$  et sa restauration par complémentation.

#### *Furine*

La furine est une enzyme membranaire, ubiquitaire, clivant un précurseur protéique après un doublet dibasique, préférentiellement Lys-Arg. Une arginine en position P-4 est aussi requise dans le précurseur clivé. La furine agit

sur de très nombreux précurseurs : hormones et facteurs de croissance, protéines plasmatiques (proalbumine, facteur de Willebrand, proC3), récepteurs tels que celui de l'insuline, glycoprotéines d'enveloppe virale. Elle agirait au niveau du Golgi et serait l'enzyme principale responsable de la maturation des précurseurs dans la voie constitutive. La furine pourrait aussi agir près de la membrane plasmique et jouer un rôle important dans l'activation extracellulaire de protéines exogènes, telles que la protéine membranaire du HIV (GP160) ou l'hémagglutinine A du virus de l'influenza.

La furine est synthétisée sous la forme d'une pré-proenzyme. Le prosegment situé dans la région N-terminale doit être clivé pour conférer son activité à la furine. La délétion de ce profragment par mutagenèse dirigée conduit à une enzyme inactive, de même que dans le cas de la subtilisine où il a été montré que le profragment est nécessaire pour assurer un repliement tertiaire correct de la protéine. Le site de clivage du profragment dans la furine est une séquence reconnue par l'enzyme elle-même (Arg-Thr-Lys-Arg) ; ce clivage pourrait être autocatalytique et survenir dans le réticulum endoplasmique ou le Golgi.

Une autre enzyme, PACE 4 (Paired basic Aminoacid Cleaving Enzyme), a aussi une distribution ubiquitaire et est localisée sur la même région du chromosome 15 que la furine chez l'homme. Elle ne possède pas de domaine transmembranaire ou d'hélice amphipathique l'insérant dans une structure membranaire. Elle pourrait agir sur de nombreux précurseurs protéiques de façon similaire à la furine.

*Prohormones convertases (PC) : PC1/3, PC2, PC4, PC5 et PC6*

Les proconvertases 1, 2, 4-6 ont été découvertes par clonage de leur cDNA grâce à l'homologie de la séquence de ces enzymes avec le domaine catalytique de la subtilisine. Les plus étudiées sont les proconvertases PC1 (encore appelée PC3) et PC2.

— *Modèles de maturation de la proinsuline et de la POMC*

Les études biochimiques de la maturation de la proinsuline en insuline dans des îlot pancréatiques avaient montré qu'il existait deux types d'endopeptidases spécifiques capables de cliver la proinsuline en insuline. Le premier clivage a lieu entre la chaîne B et le peptide de connexion et est assuré par la proinsuline convertase 1 ; un deuxième clivage se produit entre le peptide de connexion et la chaîne A grâce à la proconvertase 2. Ces deux convertases diffèrent par leur pH optimum et leur sensibilité au calcium. Une séquence partielle de ces deux enzymes avait pu être réalisée alors même que les cDNA correspondant à ces deux enzymes furent clonés par la stratégie utilisant l'homologie de séquence des proconvertases avec celle du site catalytique de la subtilisine. Les proconvertases PC1 et PC2 sont exprimées dans les cellules

béta du pancréas sécrétant l'insuline. PC1 et PC2 correspondent respectivement aux insulines proconvertases 1 et 2 qui avaient été initialement identifiées par des méthodes biochimiques. Ces deux enzymes agissent séquentiellement sur la proinsuline au niveau du doublet basique Arg<sub>31</sub>-Arg<sub>32</sub> pour PC1 et Lys<sub>64</sub>-Arg<sub>65</sub> pour PC2. La maturation complète de la proinsuline en insuline requiert donc la présence de deux proconvertases différentes, bien que les sites de clivage soient tous deux des doublets d'acides aminés basiques. Ceci illustre la spécificité de l'action des proconvertases qui repose sur la structure primaire et secondaire du précurseur, le clivage par la proconvertase étant en partie dépendant d'une structure en  $\beta$ -turn du précurseur. Ceci montre bien qu'une simple paire d'acides aminés basiques n'est pas une condition suffisante pour l'action de ces enzymes.

Ces mêmes proconvertases sont exprimées dans l'hypophyse du rat : PC1 se trouve essentiellement au niveau du lobe antérieur de l'hypophyse et PC2 dans le lobe intermédiaire. Elles agissent sur la POMC mais, là encore avec une spécificité différente pour la génération des peptides hormonaux : PC1 clive la POMC en ACTH et en  $\beta$ -LPH, PC2 clive le même précurseur en  $\beta$ -endorphine, ACTH et  $\alpha$ -MSH. PC2 et PC1 sont exprimées dans la surrénale humaine normale et pathologique (phéochromocytome). Elles peuvent cliver le proneuropeptide Y et la proenképhaline en différents peptides dérivés des enképhalines. Enfin, PC1 et PC2 sont exprimées dans de nombreux neurones et les ganglions spinaux où elles sont vraisemblablement impliquées dans la maturation de neuropeptides.

A l'inverse de la furine qui agit au niveau de la voie constitutive, PC1 et PC2 interviennent dans la maturation des hormones et des neuropeptides au niveau de la voie régulée, dans le *trans*-Golgi et les granules sécrétoires.

— *Structure, fonction et régulation des prohormones convertases*

PC1 et PC2 ne comportent pas de domaine transmembranaire mais elles possèdent à leur extrémité C-terminale une hélice amphipathique qui leur permettrait de s'associer à des structures membranaires du Golgi ou des granules sécrétoires. Ces enzymes peuvent être aussi sécrétées dans le milieu de culture de cellules endocrines ou neuro-endocrines et il n'est donc pas exclu qu'elles puissent exercer une action protéolytique à la surface des cellules qui les produisent. La maturation de ces enzymes implique, comme dans le cas de la subtilisine ou de la furine, un clivage autocatalytique ou hétérocatalytique d'un profragment situé en N-terminal.

D'autres convertases, PC4, PC5 et PC6 ont été isolées très récemment, et font partie de la même superfamille de la subtilisine. A part une isoforme de PC6, elles ne possèdent pas de domaine transmembranaire ou d'hélice amphipathique et leur localisation subcellulaire n'est pas connue. PC4 est localisée dans les cellules germinales testiculaires (spermatozoïdes matures), PC5 et

PC6 sont transcrites à un niveau élevé dans l'estomac et l'intestin mais elles sont présentes aussi dans de nombreux autres tissus. Très peu d'études fonctionnelles ont été réalisées jusqu'à présent sur PC4, PC5 et PC6 et bien que leurs substrats physiologiques ne soient pas identifiés, il est vraisemblable qu'elles sont impliquées respectivement dans la maturation des peptides testiculaires et intestinaux.

Il existe très peu de données sur le rôle limitant que ces enzymes pourraient jouer dans la conversion des précurseurs hormonaux et des neuropeptides en produits actifs. On a toutefois montré que certains traitements, comme les antagonistes de la dopamine, sont capables d'augmenter à la fois le substrat (la POMC) dans le lobe neurointermédiaire du rat ainsi que les deux proconvertases, PC1 et PC2. Inversement, la bromocryptine diminue la production de la POMC et des proconvertases. Il serait intéressant de savoir s'il existe de façon générale une régulation coordonnée entre la biosynthèse d'un substrat et celle des enzymes de maturation post-traductionnelle.

Sur le plan philogénique, les proconvertases sont présentes chez la levure, la drosophile, *C. Elegans*, et le xénope. Certaines sont des protéines membranaires intégrales (Kex2, furines de la drosophile, et de mammifères), d'autres sont dépourvues de domaine transmembranaire (proconvertases de mammifère). Toutes utilisent un site de clivage basique ou dibasique, parfois une séquence consensus complexe incluant une arginine en P-4. Leur fonction ne peut actuellement n'être évaluée qu'indirectement, du fait de l'absence d'inhibiteurs spécifiques et de pathologie humaine ou animale connue qui leur soit liée.

#### *Carboxypeptidase E/H*

Cette carboxypeptidase est une métalloenzyme à zinc qui excise séquentiellement les deux acides aminés basiques C-terminaux exposés sur le précurseur après son clivage par la proconvertase. La carboxypeptidase E/H est synthétisée sous la forme d'une préproenzyme. Elle comporte une hélice amphipathique en C-terminal qui est vraisemblablement responsable de sa liaison aux membranes des granules de maturation où elle est colocalisée avec les proconvertases. Les proconvertases et la carboxypeptidase E/H peuvent être sécrétées par les cellules hypophysaires AtT20 en culture ainsi que les peptides dérivés de la POMC. De même, les cellules médullosurrénales peuvent sécréter la carboxypeptidase E/H. La carboxypeptidase E/H est particulièrement abondante dans les cellules de la surrénale, du lobe antérieur de l'hypophyse, du cœur et de différentes régions cérébrales comme l'hypothalamus, l'hypocampe, le thalamus et le striatum.

### *Peptidylglycine alpha amidating mono-oxygénase (PAM)*

Un très grand nombre de neuropeptides sont amidés en C-terminal ce qui leur confert, pour la plupart d'entre eux, leur activité biologique. L'amidation est le fait d'une enzyme unique, la PAM, protéine bifonctionnelle qui catalyse séquentiellement deux réactions du fait de ses activités de Peptidylglycine alpha-hydroxylating mono-oxygénase (PHM) et de Peptidyl alpha-hydroxyglycine alpha-amidating lyase (PAL). Le signal d'amidation de la PAM est donc une glycine précédant le site monobasique ou le doublet basique du précurseur clivé par la proconvertase.

Cette enzyme complexe résulte d'un gène unique qui subit de nombreux épissages alternatifs. L'activité PHM est portée par la région N-terminale, l'activité PAL par la région C-terminale. L'enzyme possède un domaine transmembranaire en région C-terminale mais l'exon correspondant à cette hélice  $\alpha$  peut ne pas être transcrit ce qui rend la PAM soluble. Les deux activités de l'enzyme, PHM et PAL, peuvent être portées par des protéines distinctes résultant soit d'un épissage différentiel du mRNA, soit d'une maturation post-traductionnelle par clivage endoprotéolytique du précurseur.

La PAM est exprimée majoritairement dans le cœur mais dans cet organe son substrat n'est pas connu car il n'existe pas de peptide cardiaque amidé. Elle est exprimée par ailleurs dans l'hypophyse antérieure et dans de nombreuses régions du système nerveux central, parallèlement aux proconvertases et à la carboxypeptidase E/H.

### *Anomalies pathologiques de la maturation des prohormones*

Il n'existe pas d'affection connue résultant d'un déficit quantitatif ou qualitatif d'une proconvertase. Par contre, il existe plusieurs syndromes pathologiques résultant d'une anomalie génétique du précurseur hormonal aboutissant à une anomalie de la maturation du précurseur.

#### *Hyperproinsulinémie familiale*

L'hyperproinsulinémie familiale est une maladie autosomale dominante traduite par un diabète modéré, un taux plasmatique élevé de proinsuline et surtout un rapport anormal proinsuline/insuline dans des conditions basales et lors de la stimulation des cellules  $\beta$ -pancréatiques. Ces patients répondent normalement à l'administration d'insuline exogène, ce qui exclut un déficit au niveau des cellules réceptrices. Deux types de mutations ont été décrites : l'une localisée au niveau du site de clivage entre le peptide de liaison et la

chaîne  $\beta$  (mutation de l'Arg<sub>65</sub> par un acide aminé neutre), l'autre située à distance des sites de clivage du précurseur : mutation de l'His<sub>10</sub> de la chaîne B en Asp. Dans ce dernier cas, la proinsuline peut être convertie en insuline *in vitro* mais la mutation entraîne une instabilité *in vivo* de la proinsuline mutante qui est rapidement dégradée dans les cellules  $\beta$ -pancréatiques.

#### *Diabète insipide héréditaire central*

Une autre anomalie de la maturation d'un précurseur hormonal est le diabète insipide héréditaire central. Le gène de la vasopressine code pour trois protéines successives de 5' en 3' : la vasopressine, la neurophysine et une glycoprotéine dont la fonction est inconnue. Le diabète insipide héréditaire central du rat Brattleboro est caractérisé par l'absence de production des trois produits du gène, une hypertrophie des noyaux des neurones supraoptiques et paraventriculaires. Il n'existe pas d'anomalies de la région codante de la vasopressine ni de son site de maturation mais une délétion d'une base dans l'exon 2 du gène de la vasopressine produisant un changement du cadre de lecture de la neurophysine, un remplacement de l'arginine précédant le clivage neurophysine/glycoprotéine et l'absence de codon de terminaison.

Une affection similaire existe chez l'homme où a été décrite une forme familiale de diabète insipide, autosomale et dominante, caractérisée par une polyurie, une polydypsie et des taux effondrés de vasopressine et de neurophysine. Une mutation toujours située dans l'exon 2 du gène de la vasopressine, au niveau de la neurophysine, a été découverte dans deux familles. Ces mutations substitutives sont dans doute responsables de modifications de la conformation de la néo-protéine ainsi synthétisée. Un changement conformationnel rendrait la proconvertase inopérante au niveau de la jonction neurophysine/glycoprotéine, favoriserait la dégradation de la protéine anormale ou pourrait encore perturber son trafic intracellulaire.

Un autre type de mutation responsable de diabète insipide congénital central a été récemment décrit. Il s'agit d'une mutation dans le peptide signal modifiant le site de clivage normalement reconnu par la signal peptidase. Cette anomalie de clivage du peptide signal est similaire à celles décrites récemment dans l'hypoparathyroïdie familiale et le déficit en facteur X, où existent aussi des mutations du site de clivage de la préprotéine responsable d'un déficit de la production de protéines matures.

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, T.A. WILLIAMS, A.-M. HOUOT, S. NADAUD, E. VILLARD, A. BONNARDEAUX, M.-C. ZENNARO, T. NABIKA, I. FERY

**1 - Biologie et génétique moléculaire de l'enzyme de conversion****a) Régulation de l'expression du gène de l'ECA in vitro**

Plusieurs travaux sont en cours sur la régulation de l'expression de l'ECA par les hormones thyroïdiennes et sur les mécanismes de régulation de l'ECA dans une lignée épithéliale, la lignée CACO-2.

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

Ce programme est réalisé en collaboration avec John Mullins à Edinburgh 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. Les mâles transgéniques ne sont pas fertiles malgré la présence d'une lignée germinale apparemment intacte. La femelle transgénique obtenue est morte lors de la mise bas. De nouvelles micro-injections sont donc nécessaires. D'autres constructions intégrant le gène de l'ECA sont envisagées (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 avec un taux plus élevé d'ECA dans le plasma que celui associé à l'autre allèle (allèle I).

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. De nombreux polymorphismes ont été mis en évidence dans la région codante du gène ainsi que dans les régions régulatrices mais à ce jour aucun ne semble être le variant fonctionnel (E. Villard, A.-M. Houot).

d) *Identification des résidus du site actif de l'ECA*

Par mutagenèse dirigée, nous avons identifié deux acides aminés essentiels du site actif, un acide glutamique qui est coordonné au zinc et un aspartate qui joue un rôle indirect dans le positionnement du zinc dans le site actif (T.A. Williams).

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 structure intron-exon. Des animaux transgéniques avec le gène humain sont en cours de création en collaboration avec le groupe de M. Paul à Berlin-Buch. Grâce à la détermination de la structure du gène, nous avons identifié des séquences polymorphes au sein du gène par la technique de SSCP et nous avons isolé un marqueur microsatellite également très polymorphe (S. Nadaud, A. Bonnardeaux).

3 - *Contrôle génétique de la pression artérielle*

a) *Gènes candidats et hypertension artérielle*

Nous avons montré une association entre un polymorphisme du gène du récepteur de l'angiotensine II de type I (AT1) et l'hypertension artérielle essentielle (HTA). En revanche, dans une étude familiale nous n'avons pas pu mettre en évidence de coségrégation entre ce gène et l'HTA. Nos résultats récents ont également montré des résultats négatifs. Ces résultats concernent le gène de la NO synthase vu plus haut et celui du gène Sa, un gène très fortement lié à la pression artérielle chez le rat hypertendu (A. Bonnardeaux, T. Nabika). Pour ces deux gènes, aucune association, ni aucune liaison génétique n'a pu être détectée avec l'HTA.

b) *Structure du gène du récepteur minéralocorticoïde*

Nous avons déterminé la structure du gène et du promoteur humain du récepteur minéralocorticoïde. Il permettra notamment la poursuite de l'étude du polymorphisme de ce gène dans diverses pathologies (M.-C. Zennaro).

II. *ÉTUDE DES RAPPORTS STRUCTURE-FONCTIONS  
DE L'ANGIOTENSINOGENÈ ET DES RÉCEPTEURS MEMBRANAIRES  
DE L'ANGIOTENSINE II, DE LA VASOPRESSINE ET DE L'INSULINE*  
Equipe : E. CLAUSER, C. AUZAN, S. CONCHON, K. CURNOW, E. DAVIES,  
I. LECONTE, C. MONNOT, B. TEUTSCH

L'activité du groupe au cours de l'année 1993-94 a porté sur l'analyse de certains mutants de l'angiotensinogène et une étude de la structure et de la fonction des récepteurs membranaires. Ces études ont utilisé des techniques de biologie moléculaire (clonage, mutagenèse dirigée), de biologie cellulaire (expression de protéines recombinantes), de biochimie des protéines (Western blot, immunoprécipitation) et de physiologie cellulaire (mesure du calcium intracellulaire et de divers seconds messagers).

1 - *Angiotensinogène humain*

Plusieurs mutants de l'angiotensinogène humain ont été produits en collaboration avec X. Jeunemaitre (MCU.PH, Hôpital Broussais) et exprimés dans la lignée CHO. Le premier groupe de mutants a été imaginé afin de produire soit un angiotensinogène non clivable par la rénine pouvant avoir une fonction d'inhibiteur de cet enzyme (Remplacement par Phe<sub>10</sub>-Phe<sub>11</sub> de Leu<sub>10</sub>-Val<sub>11</sub> au niveau du site de clivage), soit un angiotensinogène clivable mais libérant une [Ala<sub>8</sub>] angiotensine II aux propriétés antagonistes de l'angiotensine II (Mutation Ala<sub>8</sub> au lieu de Phe<sub>8</sub>). Ces deux mutants ont été produits et purifiés par chromatographie d'affinité. Leurs propriétés enzymatiques, leur biosynthèse et leur structure sont en cours de caractérisation.

Un deuxième groupe d'angiotensinogènes mutés correspond à l'ensemble des mutations naturelles de l'angiotensinogène découvertes récemment chez des sujets hypertendus ou non et dont le rôle pathologique reste à montrer. Ces mutations ont été reproduites *in vitro* par mutagenèse dirigée, les angiotensinogènes recombinants mutés ont été produits et sont en cours de caractérisation, comme décrit précédemment.

2 - *Les récepteurs de l'angiotensine II*

Les récepteurs de l'angiotensine II (AT1 humain, AT1a et AT1b de rat, AT2 de rat) sont des récepteurs heptatransmembranaires, qui ont été clonés par différents groupes au cours des 2 dernières années. Grâce aux ADNc de ces récepteurs (offerts ou reclésés au laboratoire), nous avons entrepris l'expression de ces récepteurs recombinants sauvages ou mutés, afin de préciser les domaines structuraux impliqués dans leurs spécificité pharmacologiques

ou leurs voies de signalisation. De plus la structure du gène de l'AT1 humain a été approfondie ainsi que celle de ses variants.

\* L'analyse moléculaire du site de liaison de l'angiotensine II et de l'analogue non peptidique Dup 753 du récepteur AT1a de rat a été approfondie. Neuf mutations différentes des 2<sup>e</sup>, 3<sup>e</sup> et 5<sup>e</sup> domaines transmembranaires ont été réalisées et la pharmacologie et la signalisation de ces mutants ont été étudiés.

La mutation la plus intéressante concerne l'Asp74, puisqu'elle modifie la spécificité de liaison des antagonistes AT1/AT2 sans modifier celle des agonistes peptidiques et qu'elle supprime le couplage aux protéines G (C. Bihoreau et al. PNAS, 1993).

Les autres mutations soit abolissent la liaison de l'angiotensine II au récepteur (Lys<sub>102</sub> et Lys<sub>199</sub>), soit ne modifient pas le fonctionnement du récepteur (Ser<sub>105</sub>, 107 ou 109), soit enfin modifient la liaison du Dup753 mais pas celle de l'angiotensine II (Asn<sub>111</sub> et Ser<sub>115</sub>) (C. Monnot et al. en préparation).

\* L'étude comparée du fonctionnement des récepteurs AT1a, AT1b et AT2 de rat a fait l'objet de plusieurs travaux :

— L'internalisation des récepteurs AT1a et AT1b induite par les agonistes et antagonistes peptidiques de l'angiotensine II est identique et importante (80 %), alors qu'elle reste comparable mais réduite (30 %) pour le Dup753. Cette internalisation n'est pas dépendante du couplage aux protéines G (S. Conchon et al, soumis).

— La pharmacologie et la signalisation intracellulaire (production d'inositol phosphates et mobilisation du calcium intracellulaire) des récepteurs AT1a et AT1b ne révèlent pas de différences significatives. Cependant seul le récepteur AT1a est capable de transmettre l'effet mitogénique de l'AII.

— Les mécanismes de cet effet mitogénique de l'AII ont été approfondis sur les cellules CHO.AT1a. Il n'implique pas la sécrétion de facteurs de croissance tels que IGF1, FGF ou PDGF. La voie de signalisation mise en jeu implique la protéine kinase C et non les voies de l'AMP cyclique et de l'acide arachidonique (B. Teutsch et al., en préparation).

\* Enfin, la structure du gène du récepteur AT1 humain a été approfondie. Ce gène se compose de 4 exons dont les trois premiers codent pour la région 5' non traduite de l'ARN messenger, alors que le 4<sup>e</sup> code pour la protéine. Plusieurs observations intéressantes sont à souligner (K. Curnow et al. soumis) :

— Les exons 2 et 3 font l'objet d'un épissage alternatif et la distribution des différents ARNm en résultant a été étudiée par PCR.

— Les 2 premiers exons exercent un effet inhibiteur sur la traduction, dont le mécanisme est en cours d'étude.

— La présence de l'exon 3 pourrait donner naissance à un nouveau récepteur AT1 présentant une extension amino-terminale de sa séquence.

Des altérations de la séquence de ce gène ont été recherchées dans 21 adénomes de Conn par PCR (recherche de mutation par électrophorèse (SSCP) et séquençage). L'hypothèse selon laquelle l'adénome de Conn pourrait être du à une mutation constitutive du récepteur AT1, activant en permanence le récepteur et donc la production d'aldostérone par les cellules surrénaliennes, était en effet intéressante. Une telle mutation activatrice a été démontrée dans le récepteur de la TSH dans certains adénomes thyroïdiens hypersecrétants. Malheureusement aucune mutation n'a été trouvée dans la séquence du récepteur AT1 (E. Davies et al., en préparation).

### 3 - Récepteurs de la vasopressine

Avec M. Thibonnier (CWRU, Cleveland, OH, USA), nous avons cloné et caractérisé l'ADNc du récepteur humain V1a. La structure du gène a été établie. Des mutants activant constitutivement ce récepteur sont actuellement recherchés. Avec X. Bertagna (Endocrinologie, Hôpital Cochin), nous avons cloné à partir d'une banque de tumeur hypophysaire, un ADNc, qui pourrait coder pour le récepteur humain V1b. Sa caractérisation est en cours.

### 4 - Récepteur de l'insuline

L'analyse des rapports structure-fonction du récepteur de l'insuline s'est poursuivie dans 3 directions :

\* Analyse des mutants de glycosylation de la chaîne  $\beta$  du récepteur. Cette étude a essentiellement montré que les 4 sites potentiels de N-glycosylation étaient utilisés *in vivo*, mais que seule l'altération du site distal, proche de la membrane cellulaire, entraînait l'abolition de l'activation du récepteur et la perte de la transmission des effets de l'insuline. Ainsi l'activité de la tyrosine kinase du récepteur, des MAP kinases et de la PI3 kinase est réduite par cette mutation.

\* La mutation de 2 séquences conservées du domaine tyrosine kinase et leur remplacement par les séquences correspondantes des serine kinases abolit le fonctionnement du récepteur et ne lui permet pas d'acquérir une spécificité serine kinase (I. Leconte et E. Clauser, soumis).

\* Enfin, le rôle du domaine transmembranaire du récepteur dans la transmission du signal est en cours d'étude grâce à la constitution de plusieurs protéines chimères inversant la séquence de ce domaine ou la remplaçant par les domaines équivalents de plusieurs protéines ou récepteurs membranaires

(récepteur EGF, oncoprotéine neu, glycophorine etc.). Ce travail est en cours en collaboration avec le groupe de G. Cremel et P. Hubert (INSERM U338, Strasbourg).

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

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

Ce groupe a comme thème de recherche l'enzyme de conversion de l'angiotensine I (ECA) et a deux objectifs :

1) L'étude du mécanisme de libération de la forme somatique circulante de l'ECA. Une protéolyse post-traductionnelle provoque la libération de formes solubles actives. Une forme soluble est isolée soit du plasma humain, soit du milieu de culture de cellules CHO transfectées par le cDNA correspondant à la forme membranaire des cellules endothéliales vasculaires humaines, ancrée dans la membrane plasmique par l'intermédiaire d'une pièce hydrophobe de 17 aminoacides située dans la partie C-terminale de la molécule.

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 qui partagent la partie extracellulaire de la protéine en deux domaines actifs, 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 hippurique à partir du substrat synthétique Hip-His-Leu est essentiellement due au domaine C-terminal de la protéine. L'activité catalytique de l'ECA a la particularité de pouvoir être augmentée par les anions monovalents et principalement par les ions chlorure. Cette dépendance est toutefois modulée suivant la nature du substrat, le pH et le site catalytique considéré.

Notre objectif est de déterminer 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 ce site enzymatique N-terminal.

#### 1 - *Solubilisation de l'ECA endothéliale*

##### a) *Système de cellules CHO*

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 étudierons si ce mécanisme est applicable à la cellule endothéliale humaine.

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 identifié les extrémités C-terminales des formes solubles par des approches biochimiques et immunologiques. Nous utilisons une approche de biologie moléculaire et cellulaire (mutagenèse dirigée et biosynthèse) pour tenter d'identifier la localisation de la protéolyse et la classe de l'endopeptidase impliquée.

Nous avons déterminé 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.

#### b) *Mutagenèse dirigée et biosynthèse*

Pour étudier le rôle de l'arginine 1137 dans le processus enzymatique, nous avons choisi de remplacer cet aminoacide dans le cDNA codant pour l'ECA membranaire recombinante par un résidu glutamine postulant que l'enzyme responsable pouvait faire partie de la famille des « trypsine-like » ou des convertases. Dans ce cas, l'enchaînement glutamine 1137-leucine 1138 ne serait plus scindé et la libération de la forme soluble annulée. Pour un second mutant, nous avons introduit la même mutation sur la position Arg1227 contenue dans une séquence C-terminale voisine (AQQARV) de celle identifiée (AGQRL) pour le site de clivage afin de vérifier que cette séquence ne puisse fonctionner comme un site alternatif de clivage. Des ECA mutantes sont exprimées dans une lignée recombinante non mutée. Le remplacement de l'arginine du site de clivage par un résidu de glutamine ne modifie pas la sécrétion de la forme soluble et montre que la protéase impliquée n'appartient pas au groupe des convertases. De nouvelles mutations au niveau du site de clivage et dans le voisinage immédiat sont donc envisagées. Afin de mieux orienter le choix des mutations, nous avons entrepris le séquençage de l'extrémité C-terminale de l'ECA de cobaye. En effet, chez ce rongeur, le taux de l'ECA plasmatique rapporté à la quantité d'ECA membranaire pulmonaire, est anormalement élevé par rapport aux autres espèces. Sans écarter la possibilité que la protéase impliquée soit quantitativement plus élevée dans cette espèce, nous pouvons envisager que le site de clivage et son alentour soient mieux adaptés et plus spécifiques. Nous recherchons, d'autre part, des signaux localisés dans la partie cytosolique et leur rôle dans le processus de protéolyse.

A l'aide du marquage métabolique des cellules CHO transfectées par le cDNA de l'ECA endothéliale par des aminoacides marqués au soufre 35 nous étudions la biosynthèse de l'ECA et sa solubilisation. Nous démontrons par immunomarquage de surface et biotinylation par l'intermédiaire d'un cross-linker (NHSLC-biotine) que l'ECA mature est exprimée à la surface de la cellule et est solubilisée dans le milieu de culture à partir de la membrane plasmique. De plus, la solubilisation de l'ECA est, dans les cellules CHO, augmentée par le PMA (activateur de protéine kinase C).

### c) Culture de cellules endothéliales

L'extrémité C-terminale de l'ECA plasmatique étant identique à celle de la forme sécrétée par les cellules CHO transfectées, nous allons étudier la sécrétion de la forme soluble par des cellules endothéliales humaines en culture.

Nous avons trouvé une lignée de cellules endothéliales humaines spontanément immortalisées (ECV 304) qui ont pu être transfectées par le cDNA de l'ECA membranaire. Nous allons pouvoir tester la solubilisation sur cette lignée et les modifications induites par l'introduction des diverses mutations dans ce cDNA.

## 2 - Différences enzymatiques des deux sites actifs de l'ECA

### a) Spécificité du site N-terminal de l'ECA vis-à-vis du peptide Ac-Ser-Asp-Lys-Pro

La dégradation dans le plasma du peptide hémorégulateur NAc-Ser-Asp-Lys-Pro (AcSDKP), qui exerce une régulation négative sur la prolifération des cellules hématopoïétique, semble 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 trois ECA recombinantes : ECA sauvage ou portant des mutations sur les deux histidines du site actif N-terminal (domaine C-terminal actif) ou du site actif C-terminal (domaine N-terminal actif).

### b) 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. Cette étude nécessite pour chaque inhibiteur la détermination du  $K_i$  à des concentrations de chlore de 20 mM et de 300 mM.

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

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

##### 1 - *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.

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, nous avons mis au point au laboratoire la quantification des ARN messagers par reverse transcription et polymérase chain reaction (RT-PCR) en utilisant un standard interne pour vérifier que l'identification et l'efficacité d'amplification soient identiques dans tous les échantillons.

La PCR quantitative est une technique fiable pour étudier l'expression du gène de la rénine en culture primaire de cellules juxtaglomérulaires. Cette technique nous a permis de montrer que l'AMP cyclique, le monoxyde d'azote et le calcium étaient des régulateurs de l'expression du gène de la rénine en culture primaire de cellules juxtaglomérulaires. L'AMP cyclique et le monoxyde d'azote sont des stimulateurs et le calcium agit comme un inhibiteur. Le fait de pouvoir aussi mesurer la sécrétion de rénine dans les mêmes expériences a permis de montrer qu'il n'y avait pas de lien direct entre la sécrétion et l'expression du gène en culture cellulaire suggérant que ces deux paramètres étaient différemment régulés (R. Della Bruna, F. Pinet).

##### 2 - *Isolement et caractérisation des cellules chorioniques en culture*

L'étude de l'expression du gène de la rénine est rendue difficile par l'absence de lignées permanentes de cellules productrices de rénine. Jusqu'à présent, les études pour mettre en évidence les séquences *cis*-régulatrices et les facteurs *trans* impliqués dans l'expression du gène de la rénine ont été effectuées dans des lignées cellulaires n'exprimant par ce gène telles les cellules de choriocarcinome humain (JEG-3).

Au laboratoire, nous avons utilisé des cultures de cellules chorioniques pour étudier les régions régulatrices du gène de la rénine humaine. Ces cellules ont été caractérisées par les techniques de microscopie électronique et d'immunohistochimie. Un seul type cellulaire est présent en culture et est marqué uniformément par des anticorps anti-rénine et anti-prorénine. Ces cellules produisent un taux élevé de prorénine (20 ng/ml/24h) et l'ARNm codant pour

la rénine a la même taille (1,6 Kbase) que l'ARNm rénal. De plus, la mise au point de la PCR quantitative pour les ARNm codants pour la rénine humaine a permis d'étudier la régulation au niveau des messagers. Nous avons montré qu'en culture de cellules chorioniques, il existait une synergie entre la forskoline et les esters de phorbol pour stimuler l'ARNm de la rénine ainsi que la production de rénine dans le milieu.

a) *Transcription du gène de la rénine : Premiers travaux*

Dans un premier temps, nous avons étudié la région 5' du gène de la rénine qui comprend le promoteur de ce gène. Une analyse fonctionnelle a été effectuée en associant la région 5' du gène de la rénine au gène reporteur (luciférase) et en transfectant transitoirement ces constructions dans les cellules chorioniques. L'activité luciférase mesurée reflète l'activité du promoteur de la rénine. Le gène reporteur luciférase est 10 fois plus sensible que le gène CAT et a donc été utilisé préférentiellement.

Les premières constructions associant les 2616, 892 et 582 paires de bases du promoteur ont à peu près la même activité lorsqu'elles sont transfectées dans les cellules chorioniques et n'ont donc pas permis de révéler d'éléments majeurs de régulation dans la région distale du promoteur. Pour localiser précisément les régions importantes du promoteur intervenant dans l'expression du gène de la rénine, une analyse par délétion des 582 premières paires de bases a été effectuée. Ces expériences ont permis de montrer que les 110 premières paires de base du promoteur étaient suffisantes pour permettre une expression élevée et spécifique dans les cultures de cellules chorioniques.

b) *Identification des régions cis et des facteurs trans*

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

Les expériences de transfection nous ayant montré une augmentation de l'activité luciférase dans les 374 premières paires de base du promoteur, nous avons effectué les premières expériences de protection à la DNase I sur cette région. Six empreintes ont été obtenues dont cinq pourraient correspondre à des facteurs nucléaires décrits dans la littérature. L'analyse par délétion du promoteur de la rénine a permis de montrer qu'un élément négatif se trouvait entre - 374 et - 273 paires de bases. Une empreinte a été obtenue dans cette région et présente une forte homologie avec une séquence du gène de l'angiotensinogène de souris qui lie un facteur constitutif, appelé AGE3 par les auteurs, qui pourrait jouer un rôle lors de l'expression de l'angiotensinogène au cours de la différenciation des préadipocytes en adipocytes. Des

délétions du promoteur de la rénine jusqu'à - 137 paires de base ont montré la présence d'un autre élément négatif. Cette région comprend une séquence qui a une forte homologie avec une séquence liant le facteur ARP-1, membre de la superfamille des récepteurs aux stéroïdes orphelins, qui est un facteur de régulation inhibiteur du gène de l'apolipoprotéine A1. Des délétions jusqu'à - 67 paires de base ont montré une augmentation de l'activité luciférase. Deux empreintes ont été trouvées dans la région - 110 à - 67 paires de base en utilisant des extraits nucléaires de cellules chorioniques : une empreinte pour laquelle aucune homologie avec des éléments de régulation connus n'a pu être déterminée, une autre qui est une région riche en A/T est similaire au facteur Pit1 (membre de la famille des facteurs de transcription POU). L'activité luciférase la plus élevée a été obtenue avec le plasmide p67+. Cette région du promoteur de la rénine lie le facteur Ets, qui a été décrit comme un activateur de transcription dans chaque tissu.

c) *Mise en évidence d'un élément de réponse à l'AMP cyclique (CRE)*

Une empreinte correspondant à un CRE (cyclic AMP responsive element), située en - 234/- 214 a été mise en évidence. Des expériences de gel retard ont permis de mettre en évidence des complexes ADN-protéines qui sont déplacés par un oligonucléotide contenant le site de liaison consensus de la protéine CREB et les régions flanquantes du gène de la somatostatine. Pour corroborer ces résultats, 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 base du promoteur sont suffisantes pour obtenir une stimulation par la forskoline de trois fois. Des délétions jusqu'à - 130 (délétion du CRE) diminuent et jusqu'à - 67 (délétion du CRE et Pit1) suppriment la réponse à l'AMP cyclique. Ces résultats laissent supposer que le facteur CRE et le facteur Pit1 agissent de concert pour conférer une réponse complète à l'AMP cyclique (S. Germain, T. Konooshita, S. Fuchs, J. Philippe, S. Girardin, F. Pinet).

3 - *Expression des protéases de type Kex2, PC2 et PC1/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 phéochromocytomes qui expriment PC2 ou PC1/PC3. La présence de PC2 dans ce tissu a aussi été montrée en utilisant les techniques d'hybridation *in situ* et

d'immunohistochimie. Ces résultats démontrent qu'une endoprotéase de type Kex2 est exprimée dans les phéochromocytomes humaines qui pourrait être impliquée dans le processing de la proenképhaline dans ces tissus (T. Konoshita, F. Pinet).

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

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

*1 - Ontogénèse des récepteurs de l'angiotensine II*

La liaison de l'angiotensine II (AngII) au récepteur de type 1 (AT1) est responsable des effets connus de cette hormone peptidique sur l'homéostasie cardiovasculaire et la régulation de l'équilibre hydrominéral. En plus du récepteur AT1, il existe au moins un autre type de récepteur caractérisé pharmacologiquement (AT2) mais auquel on ne peut encore attribuer aucune fonction précise. Un rôle de médiateur des effets de l'AngII sur la croissance cellulaire a été proposé mais pas démontré. Cette hypothèse a été avancée à la suite d'observations sur le fœtus de rat qui est très riche en récepteurs de l'AngII (AT2 et AT1).

Après avoir étudié précédemment la distribution des ARNm des deux isoformes du récepteur AT1 au cours du développement fœtal et post-natal et chez le rat adulte, une étude parallèle par hybridation *in situ* du récepteur AT2 a été entreprise. Il est apparu que l'ARNm du récepteur AT2 : 1) est exprimé précocement au cours du développement ; 2) a une distribution différente de celle du récepteur AT1 ; 3) disparaît progressivement pendant les deux premières semaines après la naissance, sauf dans la surrénale et l'ovaire.

*a) Apparition précoce du récepteur AT2*

A 12 jours de gestation, l'ARNm du récepteur AT2 est détectable par hybridation *in situ* dans deux chaînes para-axiales symétriques le long de l'aorte. Cette structure pourrait correspondre à l'ébauche de la chaîne ganglionnaire sympathique et de la médullo-surrénale. Un travail en cours permettra de déterminer à quel stade et dans quelles cellules commence l'expression de l'ARNm du récepteur AT2. En plus de cette chaîne, certains feuillet somitiques ainsi que le mésenchyme mésonéphrétique expriment aussi l'AT2, quoique plus faiblement.

b) *Distribution du récepteur AT2 dans le fœtus de rat ; comparaison avec le récepteur AT1*

La distribution du récepteur AT1 correspond à ce que l'on pouvait attendre d'après les effets physiologiques de l'AngII (foie, gros vaisseaux, rein, surrénale, cœur) ; en outre, certains mésenchymes différenciés (périchondre) ou indifférenciés expriment aussi le récepteur AT1. Le récepteur AT2 apparaît plus largement exprimé, quoique de façon très sélective également. En plus des ganglions sympathiques l'ARNm du récepteur AT2 est détectable dans un grand nombre de mésenchymes de la face et du thorax, dans la langue, la paroi des gros vaisseaux arrivant et repartant du cœur, les artères coronaires, la trachée et les bronches, le rein et la surrénale (zone glomérulée et médulla), dans tous les mésenchymes entourant les cartilages des membres et de la queue, et autour du canal de Wolff. Cette distribution se retrouve à tous les stades de 12 à 21 jours de gestation suivant la différenciation des tissus et des organes. Dans le rein, par exemple, l'ARNm du récepteur AT2 est d'abord détectable dans le cortex externe aux stades précoces où les premiers glomérules se différencient (15 jours), puis des travées de cellules positives descendent dans le cortex profond et la médulla externe, et finalement après la naissance le récepteur AT2 est détecté dans la médulla interne ou papille. Cette distribution est tout-à-fait différente de celle de l'AT1 qui est exprimé dans les glomérules, les vasa recta et certains mésenchymes apparemment distincts de ceux où le type AT2 est exprimé. Une étude microscopique est en cours pour identifier précisément les types cellulaires exprimant le récepteur AT2.

c) *Disparition du récepteur AT2 après la naissance*

Les travaux par liaison de ligands radioactifs sur coupe histologique avaient démontré une chute brutale de la liaison spécifique de l'angiotensine II au récepteur AT2 entre 24 et 72 heures après la naissance. On pouvait donc penser que cela correspondait à un arrêt de la transcription de l'ARNm dès les premières heures de la vie. Notre travail a montré que ce n'est pas le cas. Soit l'expression de l'ARNm de l'AT2 reste forte comme dans la surrénale, soit il se produit une diminution très progressive du signal d'hybridation de l'AT2 dans tous les mésenchymes suivant une chronologie qui semble corrélée avec la différenciation des mésenchymes en muscles lisses (vaisseaux, estomac) ou striés (membres, langue, peau, thorax, face, troncs artériels). Ce processus de disparition est beaucoup plus lent que ce qui a été rapporté par autoradiographie. Ainsi, à 10 jours après la naissance, alors que l'on ne détecte plus de récepteur par autoradiographie, la langue, les reins, les gros vaisseaux et d'autres tissus expriment encore l'ARNm du récepteur AT2. Cette différence entre la détection de la liaison de l'AngII et de l'ARNm n'est pas facilement explicable sauf si l'ARNm continue d'être transcrit pendant plusieurs jours

après que la protéine a cessé d'être traduite. Une réponse à cette question sera envisageable lorsque des anticorps anti-récepteur seront disponibles ou lorsque les effets de l'AngII médiés par le récepteur AT2 seront connus.

Cette étude du récepteur AT2 par hybridation *in situ* permet de dégager deux conclusions :

— Le récepteur AT2 semble exprimé seulement dans les cellules en voie de différenciation et il disparaît de ces cellules lorsqu'elles ont acquis leur différenciation morphologique et fonctionnelle définitive.

— Le point commun à la plupart des types de cellules exprimant le récepteur AT2 est de dériver des crêtes neurales.

Nos observations nous conduisent à postuler un rôle de facteur de croissance/différenciation pour l'AngII au cours du développement, rôle qui serait médié par le récepteur AT2. Un projet sur le fœtus de rat et l'embryon de poulet a été élaboré pour vérifier ce rôle de l'angiotensine II pendant le développement.

## 2 - Enzyme de conversion de l'angiotensine II

Cette enzyme, qui est surtout connue comme un des composants du système rénine-angiotensine vasculaire, cardiaque et cérébrale, est aussi exprimée en grande quantité dans certains épithéliums (intestin et tubule proximal du rein) et dans l'épithélium germinatif des tubes séminifères.

Un travail par hybridation *in situ* et immunohistochimie a permis de décrire précisément le stade d'apparition de cette enzyme dans les cellules germinales mâles en fonction du stade de différenciation pour la méiose, il a été montré que le début de l'expression de l'enzyme de conversion coïncide avec la fin de la méiose (spermatide aux stades 4 à 4), avec un maximum d'expression observée dans les spermatides en phase d'allongement (stade 8 à 12).

Cette enzyme semble être plus largement distribuée dans les cellules germinales dans la membrane plasmique et dans d'autres structures cellulaires. En particulier, la région golgienne présente, au stade spermatides jeunes, une immunoréactivité forte pour les anticorps anti-enzyme, tandis que le cytoplasme et la membrane plasmique des mêmes cellules sont encore dépourvus d'enzyme. Une étude de la localisation ultrastructurale de l'enzyme dans les cellules germinales n'a pas permis de confirmer cette localisation car aucune immunoréactivité n'a été retrouvée à l'échelon ultrastructural ni dans le Golgi, ni dans les autres sites où l'enzyme est normalement présente. L'enrobage en résine, même hydrophile, semble être incompatible avec la conservation de l'immunoréactivité de l'enzyme de conversion.

L'expression de l'enzyme de conversion de l'angiotensine dans les cellules germinales mâles soulève la question de son rôle, en particulier comme

composant d'un éventuel système rénine-angiotensine local. Pour cela un travail par hybridation *in situ* a été réalisé pour détecter la présence des autres composants de ce système dans les tubes séminifères. Un signal faible correspondant au récepteur AT1 a été observé dans les cellules germinales de souris à un stade de la spermatogénèse un peu plus précoce que l'enzyme de conversion. Mais comme il ne semble pas que la rénine ou l'angiotensinogène soient exprimés à l'intérieur des tubes séminifères, la question d'un éventuel système rénine-angiotensine local reste donc posée.

### 3 - Internalisation du récepteur AT1 de l'angiotensine II

Ce récepteur fait partie de la famille des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G. Ces récepteurs sont internalisés après liaison avec leur ligand, et probablement recyclés. Une étude ultrastructurale par autoradiographie avec de l'AngII marquée a été débutée pour suivre ce processus d'internalisation dans des cellules CHO transfectées avec l'ADNc du récepteur AT1a.

## VI. ÉTUDE DE L'ACTIVITÉ ET DU RÔLE FONCTIONNEL DES NEURONES ANGIOTENSINOGERGIQUES, NOTAMMENT DANS LE CONTRÔLE DE LA PRESSION ARTÉRIELLE ET LA SÉCRÉTION DES HORMONES HYPOPHYSAIRES

Equipe : C. LLORENS-CORTES, Z. LENKEI, G. VAZEUX, M. VUILLEMIN

Le thème de ce groupe de travail est l'étude du rôle des peptides angiotensinergiques dans le contrôle central de la pression artérielle et de la régulation de la soif. L'accent sera mis : 1) sur le métabolisme de l'angiotensine II en angiotensine III, peptide important dans les effets du système rénine-angiotensine au niveau central et 2) sur les récepteurs de l'angiotensine II dans le système nerveux central et l'hypophyse. L'aminopeptidase A qui convertit l'angiotensine II en angiotensine III sera étudiée en détail.

### 1 - Ectoenzymes et métabolisme de l'AngII cérébrale

a) *Rapport structure/fonction de l'aminopeptidase A par mutagenèse dirigée et expression dans les cellules eucaryotes*

a) Nous avons étudié le rôle du segment hydrophobe N-terminal dans l'attachement de l'APA à la membrane et le mécanisme de sécrétion de la forme soluble de l'APA. Trois lignées cellulaires eucaryotes hétérologues ont été obtenues par transfection :

— ADNc contenant la totalité de la séquence codante de l'APA membranaire ;

— ADNc codant pour une APA dont la partie cytoplasmique a été déléetée ;

— ADNc codant pour une APA où une séquence hydrophile SQNS a été insérée dans le domaine transmembranaire à un emplacement calculé pour augmenter la probabilité de clivage par la signal peptidase (algorithme de Van Heijne).

Les premiers résultats obtenus montrent que :

i) la délétion du domaine cytoplasmique induit la formation d'une forme soluble de l'APA. Ses propriétés enzymatiques ( $K_m$ ,  $K_i$  de différents inhibiteurs, sensibilité au  $Ca^{++}$ , à l'EDTA), biochimiques et immunologiques (reconnaissance par différents anticorps dirigés contre l'APA murine) sont identiques à celles de l'APA membranaire sauvage. Des expériences de marquage métabolique, suivies d'immunoprécipitation et de séquençage N-terminal de l'APA marquée sont en cours et devraient permettre d'identifier le site de clivage de la signal peptidase.

ii) l'insertion de la séquence hydrophile dépourvue du domaine transmembranaire provoque une forte diminution de l'expression de l'APA, probablement liée à un changement de conformation de la protéine, entraînant une modification de son trafic intracellulaire.

Par ailleurs, cette insertion entrave l'ancrage dans la membrane de l'APA résiduelle, probablement en déstabilisant l'hélice  $\alpha$  hydrophobe (22 acides aminés) qui constitue le domaine transmembranaire.

b) Nous voulons explorer, l'implication de certains acides aminés (présents dans la séquence de l'APA) *dans l'activité catalytique* de l'APA par des expériences de mutagénèse dirigée et expression dans les cellules eucaryotes : rôle notamment des acides aminés impliqués dans la liaison du  $Zn^{++}$ , du  $Ca^{++}$ , ainsi que ceux impliqués dans la liaison de l'extrémité  $NH_3^+$  terminale du substrat. Ce programme s'inscrit dans la recherche antérieure du laboratoire sur l'identification des différents acides aminés des deux sites actifs de l'ECA.

b) *Rôle physiologique de l'APA dans le métabolisme de l'AngII endogène et la production d'AngIII*

— *Localisation cérébrale de l'APA*

Pour cela deux approches ont été utilisées :

— localisation de la protéine en mesurant son activité enzymatique à l'aide d'un substrat synthétique (Glu- $\beta$ -naphtylamide) en présence ou en absence

d'un inhibiteur spécifique sur des homogénats de noyaux cérébraux prélevés sur coupes congelées.

— localisation du messenger par hybridation in situ à l'aide d'une riboprobe.

Ces deux approches nous ont permis de localiser l'APA dans des structures cérébrales comme l'organe subfornical (SFO), l'organe vasculaire de la lame terminale (OVLT), le noyau paraventriculaire (PVN) et l'éminence médiane (ME), connues pour exprimer les récepteurs AT1 et l'ECA.

Cette localisation de l'APA proche de celle des récepteurs AT1 et de l'ECA est en faveur d'un rôle clé de cette enzyme dans la transmission des neurones angiotensinergiques.

— *Mise au point d'inhibiteurs spécifiques*

La synthèse d'inhibiteurs spécifiques de l'APA est déterminante pour estimer son rôle fonctionnel. La conception et la synthèse de ces produits sont effectuées dans l'unité INSERM U266 dirigée par B. Roques (Equipe de M.C. Fournié-Zaluski). Le test d'activité de ces produits sur l'APA purifiée, sur le métabolisme de l'AngII in vitro ou in vivo, ainsi que leur effet sur la pression artérielle après administration par voie i.c.v. seront réalisés à l'Unité 36 INSERM.

L'APA appartient, comme la thermolysine, la NEP ou l'aminopeptidase N (APN) à la famille des métalloprotéases à zinc. La sélectivité de ces différentes enzymes semble dépendre principalement des interactions des chaînes latérales des acides aminés des substrats avec les sous-sites spécifiques de ces peptidases. La mise au point de ces inhibiteurs se fera à partir du Glu-thiol décrit par Wilks et Thurston dont le pouvoir inhibiteur est de  $10^{-7}$ M sur l'APA ainsi que sur une enzyme très proche, l'APN. Le but est donc d'améliorer la spécificité vis-à-vis de l'APA par rapport à l'APN ainsi que d'augmenter l'affinité vis-à-vis de cette enzyme.

Pour l'instant, parmi les 40 produits synthétisés, le 3-amino-4thio-butyl sulfonate présente un pouvoir inhibiteur de  $3 \times 10^{-7}$ M sur l'APA et est 100 fois moins actif sur l'APN, dénotant une spécificité de reconnaissance pour l'APA. Par ailleurs, parmi ces produits, l'un d'entre eux, le 2-amino-1,5 dithiolo-pentane, s'est révélé être un inhibiteur sélectif de l'APN ( $K_i = 3 \times 10^{-8}$ M sur l'APN,  $2 \times 10^{-6}$ M sur l'APA). Une bonne sélectivité ayant été obtenue, il reste à améliorer l'affinité pour l'APA (programme en cours).

### c) *Etudes des inhibiteurs de l'APA*

1) *In vitro*, sur la dégradation d'un substrat synthétique (Glu- $\beta$ -naphthylamide) ou d'un substrat naturel, l'angiotensine II tritiée.

2) *In vitro*, sur la dégradation d'un substrat synthétique par des homogénats de cerveau.

3) *In vivo*, sur le métabolisme de l'angiotensine II tritiée exogène injectée par voie intracérébroventriculaire.

Ces expériences ont montré que ces inhibiteurs avaient la même affinité pour l'APA purifiée quel que soit le substrat utilisé. Ils se sont révélés être des outils indispensables pour détecter une activité APA dans différentes structures cérébrales. Injectés *in vivo*, ils diminuent le métabolisme de l'angiotensine II exogène et préviennent la formation d'angiotensine III. Il reste à étudier l'effet de ces inhibiteurs *in vivo* par voie i.c.v. sur le métabolisme de l'AngII endogène et sur la formation de l'AngIII endogène.

Si l'hypothèse de départ est correcte, l'injection *in vivo* de cet inhibiteur devrait produire de façon concomitante une augmentation du taux d'AngII endogène et une chute du taux d'AngIII endogène, démontrant le rôle physiologique de l'APA dans le métabolisme de l'AngII.

## 2 - Récepteurs de l'angiotensine II (AT1a, AT1b). 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.

### a) Développement d'une quantification des messagers des récepteurs AT1a, AT1b par RT-PCR

Afin d'estimer l'expression de ces deux sous-types de récepteurs, 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 délétées.

### b) Distribution et régulation de l'expression des messagers des récepteurs AT1a et AT1b à la périphérie

Ayant mis au point ces conditions, nous avons pu estimer le nombre de copies (par  $\mu\text{g}$  d'ARN total) 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. D'autres, comme l'hypophyse ou les surrénales, sont très riches en messager du récepteur AT1b. Nous avons ensuite étudié chez le rat la modification d'expression de ces messagers dans des conditions physiopathologiques connues pour activer le

système rénine-angiotensine. Ainsi, lors d'un régime désodé, nous avons observé dans les surrénales, une augmentation des messagers de ces deux sous-types alors que dans un modèle d'hypertension rénovasculaire, l'expression des récepteurs AT1b est diminuée et celle des récepteurs AT1a inchangée.

En conclusion, l'expression ainsi que la régulation différentielle de ces deux sous-types de récepteurs dans différents organes, suggèrent qu'ils pourraient respectivement médier différentes actions biologiques de l'angiotensine II.

c) *Etude de l'expression des récepteurs AT1a et AT1b dans le SNC*

Nous avons étudié la distribution des messagers des récepteurs AT1a et AT1b dans le cerveau de rat par :

— *Quantification par RT-PCR* : L'extraction d'ARN sur des noyaux micro-disséqués prélevés sur coupes congelées de 300  $\mu$  à l'aide d'un système d'emporte-pièce vient d'être mise au point grâce à l'utilisation d'un entraîneur (tRNA de levure), nous permettant de quantifier par RT-PCR le messager des récepteurs AT1 sur les noyaux arqués et paraventriculaires prélevés sur quatre animaux. Une étude pilote a permis de montrer dès maintenant l'expression prédominante du récepteur AT1a dans ces deux structures ainsi que dans l'éminence médiane et le noyau du tractus solitaire.

*Hybridation in situ* : Parallèlement aux expériences de RT-PCR quantitative, la distribution des messagers des récepteurs AT1a et AT1b sera explorée par des études d'hybridation in situ, utilisant des ribosondes spécifiques de ces deux sous-types. Une étude pilote a déjà permis de montrer la présence prédominante des messagers du récepteur AT1a dans le SFO, l'OVLT, le MnPO, le PVN, le noyau arqué, le NTS, l'amygdale, l'hippocampe) (AT1a  $\gg$  AT1b). Par ailleurs, des expériences utilisant le double marquage permettront d'identifier les populations neuronales exprimant ces récepteurs.

Cette étude va se poursuivre par une cartographie complète de ces deux sous-types ainsi que par une étude de leur régulation dans différents modèles physiopathologiques (rôle de la soif, des œstrogènes, de l'hypertension) ceci afin de définir les fonctions respectives de ces deux sous-types de récepteurs.

## BIBLIOGRAPHIE

1993

BIHOREAU C., MONNOT C., DAVIES E., TEUTSCH B., BERNSTEIN, K.E., CORVOL P. and CLAUSER E. Asp74 mutations of the rat angiotensin II receptor confer changes in antagonist affinities and abolish G protein coupling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90 : 5133-5137, 1993.

BIHOREAU C., MONNOT C., DAVIES E., TEUTSCH B., BERNSTEIN, K.E., CORVOL P. & CLAUSER E. Molecular pharmacology and biology of the angiotensin II receptors. *Progress in endocrinology- Proc. IX intern. Cong. Endocrinol. Mornex, R., Jaffiol, C. & Leclerc J. Ed. Parthenon Publ. London pp. 472-476, 1993.*

VICART P., TESTUT P., SCHWARTZ J.C., LLORENS-CORTES C., DEBLOUIS C. and PAULIN D. Cell adhesion markers are expressed by a stable human endothelial cell line transformed by the SV40 large T antigen under vimentin promoter control. *J. Cell. Physiol.*, 157 : 41-51, 1993.

CAROFF N., DELLA BRUNA R., PHILIPPE J., CORVOL P. and PINET F. Regulation of human renin secretion and renin transcription by quantitative PCR in cultured chorionic cells — Synergistic effect of cyclic AMP and protein kinase C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 193 : 1332-1338, 1993.

TESTUT P., SOUBRIER F., CORVOL P. and HUBERT C. Functional analysis of the human somatic angiotensin I-converting enzyme gene promoter. *Biochem. J.*, 293 : 843-848, 1993.

RACZ K., PINET F., MARTON T., SZENDE B., GLAZ E. and CORVOL P. Expression of steroidogenic enzyme messenger ribonucleic acids and corticosteroid production in aldosterone-producing and non-functioning adrenal adenomas. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 77 : 677-682, 1993.

DELLA BRUNA R., KURTZ A., CORVOL P. and PINET F. Renin mRNA quantification using polymerase chain reaction in cultured juxtaglomerular cells. Short-term effects of cAMP on renin mRNA and secretion. *Circ. Res.*, 73 : 639-648, 1993.

BELDENT V., MICHAUD A., WEI L., CHAUVET M.-T. and CORVOL P. Proteolytic release of human angiotensin-converting enzyme. Localization of the cleavage site. *J. Biol. Chem.*, 268 : 26428-26434, 1993.

WARD K., HATA A., JEUNEMAITRE X., JELIN C., NELSON L., NAMIKAWA C., FARRINGTON P.F., OGASAWARA M., SUZUMORI K., TOMODA S., BERREBI S., SASAKI M., CORVOL P., LIFTON R.P. and LALOUEL J.-M. A molecular variant of angiotensinogen associated with preeclampsia. *Nature Genet.*, 4 : 59-61, 1993.

1994

THIBONNIER M., AUZAN C., MADHUN Z., WILKINS P., BERTI-MATERA L. & CLAUSER E. Molecular cloning, sequencing and functional expression of a cDNA encoding the human V1a vasopressin receptor. *J. Biol. Chem.*, 1994, 269 : 3304-3310.

DAVIES E., BONNARDEAUX A., LATHROP G.M., CORVOL P., CLAUSER E. & SOUBRIER F. The human angiotensin II (type 1) receptor gene : localization of a dinucleotide repeat polymorphism and genetic mapping. *Hum. Mol. Gen.*, 1994, 3 : 838.

CONCHON S., MONNOT C., SIRIEX M.E., BIHOREAU C., CORVOL P. & CLAUSER E. Synthetic cDNA encoding the rat AT1a receptor : a useful tool for structure-function relationship analysis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1994, 199 : 1347-1354.

CLAUSER E. Quelles perspectives thérapeutiques pour les antagonistes des récepteurs de l'angiotensine II ? *Lett. Pharmacol.*, 1994, 8 : pp. 31-33.

KONOSHITA T., GASC J.-M., VILLARD E., TAKEDA R., SEIDAH N.G., CORVOL P. and PINET F. Expression of PC2 and PC1/PC3 in human pheochromocytomas. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 99 : 307-314, 1994.

SHANMUGAM S., MONNOT C., CORVOL P. and GASC J.-M. Specific distribution of the angiotensin II AT1 receptor subtypes mRNAs in the rat fetus. *Hypertension*, 23 : 137-141, 1994.

SIBONY M., SEGRETAIN D. and GASC J.-M. Angiotensin converting enzyme (ACE) in murine testis : step-specific expression of the germinal isoform during spermatogenesis. *Biol. Reprod.*, 50 : 1015-1026, 1994.

NADAUD S., BONNARDEAUX A., LATHROP M. and SOUBRIER F. Gene structure, polymorphism and mapping of the human endothelial nitric oxide synthase gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 198 : 1027-1033, 1994.

ZENNARO M.-C., BORENSZTEIN P., SOUBRIER F., ARMANINI D. and CORVOL P. The enigma of pseudohypoaldosteronism. *Steroids*, 59 : 96-99, 1994.

#### EXPOSÉS, CONGRÈS

Monsieur Eric Clauser a participé aux congrès, colloques et formations suivants : XXXIV<sup>es</sup> Journées Annuelles de Diabétologie, Hôtel-Dieu (Paris, mai 1993) ; American Diabetes Association Meeting. Las Vegas, USA - June 12-15th 1993 ; 29th Annual Meeting of the EASD - Istanbul, 6-9 septembre 1993 ; Stage d'initiation à la biologie moléculaire. G.R.R.C. Le Vésinet 25-

26 oct. 1993 ; Colloque INSERM-MSD. Marne-la-Vallée. 23-24 nov. 1993 ; Atelier : Initiation à la biologie moléculaire. XIII<sup>es</sup> Journées de l'hypertension artérielle. Paris 16-17 déc. 1993 ; Molecular endocrinology : from the gene to the clinic. 2nd INSERM-Weizmann conference. 5-10 déc. 1993 Rehovot-ISRAEL.

Madame Catherine Llorens-Cortes a donné des séminaires dans différentes unités INSERM et CNRS : INSERM U 332 (MF Russo Marie) - Paris ; INSERM U36 (R. Ardaillou) - Paris ; INSERM U266 (B.P. Roques) - Paris ; CNRS UA637 (S. Nicolaidis) - Paris. Elle a participé à des exposés à l'étranger : Université de Montréal, Département de Biochimie (P. Crine) - Montréal ; Montreal Neurological Institute McGill University - Neurobiology Group (A. Beaudet) - Montréal. Elle a participé au Colloque franco-mexicain sur les Neurosciences organisé par L'INSERM et le Conacyt (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnologia) - Mexico (6-13 février 1993).

Monsieur Florent Soubrier a été invité aux séminaires suivants : London Society of Hypertension, Mars 94 (invitée) ; International Society of Hypertension, Melbourne, Mars 94 (invitée) ; Chairman et intervenant invité au Symposium satellite « Genes and Genetics of Hypertension », Sydney, Mars 94 ; Orateur invité au Congrès de la Société Européenne de Génétique.

Mademoiselle Florence Pinet a participé aux congrès suivants : 6th European Meeting on Hypertension (4-7 juin 1993) ; 75th Annual Meeting of the Endocrine Society (9-12 juin 1993) ; 66th Annual Congress of Japanese Society of Endocrinology (2-5 juin 1993) ; Gordon Research Conference on Angiotensin (February 13-18, 1994) ; 76th Annual Meeting of the Endocrine Society (15-17 juin 1994).

Monsieur Pierre Corvol a participé aux congrès suivants : Conférence plénière à l'Am. Soc. Nephrology, Boston, USA ; Conférencier au 50<sup>e</sup> anniversaire des Laurentian Hormone Conference, Porto Rico, USA ; Invité à présenter la « Michael J. Peach Memorial Lecture », Charlottesville, USA ; Conférencier à l'Aldosterone Conference, Lorne, Australie.

#### ENSEIGNEMENTS

Monsieur Eric Clouser a participé aux enseignements suivants : DEA de Biochimie (P<sup>r</sup> Morange) ; DEA d'endocrinologie moléculaire (P<sup>r</sup> Milgrom) ; DEA Structure et fonctionnement des systèmes biologiques intégrés (P<sup>r</sup> Rossignol) ; DEA Biologie de la cellule normale et pathologique (D<sup>r</sup> Rosselin) ; DEA de pharmacologie (D<sup>r</sup> Hanoune) ; C2 d'endocrinologie (D<sup>r</sup> Vincens).

Madame Catherine Llorens-Cortes a participé à l'enseignement au Forum des Jeunes Chercheurs ainsi qu'au DEA de Pharmacologie Moléculaire (B. Roques) et à la Société de Biologie ; au Jury du DEA de Neurosciences Paris VI-Paris IX ; à la soutenance d'Eric Chauvel (Thèse de Doctorat de l'Université de Paris V).

Monsieur Florent Soubrier a participé aux enseignements suivants : C2 de Maîtrise de Sciences Biologiques et Médicales ; Cours sur les gènes du système rénine-angiotensine ; Certificat de Bioéthique de la Faculté de Pharmacie ; Cours sur la Médecine Prédictive ; C2 de Maîtrise de Biochimie et de Biologie Moléculaire ; Faculté de Médecine de Créteil . DEA « Endocrinologie et Interactions Cellulaires » (Paris XI), Séminaires Méthodologiques et Direction des Séminaires Etudiants ; DEA de Biologie, Physiologie et Physiopathologie des Appareils Respiratoires et Circulatoires, Séminaire ; DEA de Pharmacologie Cardiovasculaire, Séminaire.

#### LISTE DES DIPLÔMÉS

1992-1993

##### *DEA*

Stéphane GIRARDIN - DEA de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire - Paris VI.

Christophe BONNEFOY - Endocrinologie et Interaction Cellulaire - Paris VI.

##### *Thèse*

Isabelle LECONTE : *Mutagenèse du récepteur humain de l'insuline — Rôle de la N-glycosylation de la sous unité  $\beta$  et de deux séquences conservées du domaine tyrosine kinase.* 5 mai 1994.