

Médecine expérimentale

M. Pierre CORVOL, membre de l'Institut
(Académie des Sciences), professeur

Hormones minéralocorticoïdes et régulation cardiovasculaire

Les étapes importantes de nos connaissances sur l'aldostérone ont été marquées par sa cristallisation en 1953 par Simpson et Tait, la découverte de son effet sur le transport unidirectionnel du sodium à travers les structures épithéliales grâce à la mesure du courant de court-circuit dans les épithéliums de batraciens, la mise en évidence d'un récepteur nucléaire spécifique par Edelman et son clonage en 1987 par Ariza. Des données récentes permettent de mieux comprendre le mode d'action de l'aldostérone au niveau de ses différents tissus cibles et ouvrent de nouvelles perspectives sur son importance dans la régulation cardiovasculaire.

Le schéma classique proposé par Edelman en 1968 reste toujours d'actualité mais s'est notablement enrichi : au niveau des cellules épithéliales, en particulier celles du tube collecteur rénal, l'aldostérone augmente en quelques heures la perméabilité apicale au sodium ; il en résulte une augmentation de la concentration de sodium intracellulaire suivie d'une activation de la $\text{Na}^+ \text{K}^+$ ATPase avec extrusion du sodium dans le milieu extracellulaire. Ce mécanisme fait intervenir une synthèse protéique mais la (ou les) protéine(s) induite(s) par l'aldostérone reste(nt) inconnue(s) : L'administration aiguë d'aldostérone n'entraîne ni augmentation des sous-unités de la $\text{Na}^+ \text{K}^+$ ATPase chez les mammifères, ni synthèse accrue des sous-unités du canal épithélial au sodium. Un traitement chronique par l'aldostérone ou la déoxycorticostérone augmente la conductance apicale au sodium, accroît l'activité de la $\text{Na}^+ \text{K}^+$ ATPase localisée sur la membrane basolatérale ainsi que l'excrétion apicale du potassium par augmentation de la conductance apicale du potassium et diminue le transport du chlore au niveau des shunts paracellulaires. Ces effets de l'aldostérone sur la réabsorption de sodium et la sécrétion de potassium s'effectuent essentiellement dans le néphron distal, au niveau du tube collecteur situé dans la corticale et la partie externe de

la médullaire rénale. La sécrétion d'ions H^+ dépendant de l'aldostérone s'effectue dans les mêmes segments tubulaires.

L'un des progrès récents a été la remise en cause du concept d'hormone « minéralocorticoïde », concept qui voulait qu'à une hormone (aldostérone) corresponde un récepteur (minéralocorticoïde) présent dans un type cellulaire (cellule épithéliale) et responsable d'une fonction (transfert actif de Na^+ dans le secteur extracellulaire). Différentes données expérimentales ont remis en question ce schéma simplificateur. En effet, il est apparu que les cellules épithéliales du néphron et du colon distal possèdent des récepteurs minéralocorticoïdes et aussi glucocorticoïdes. Dans certaines conditions, les glucocorticoïdes peuvent exercer un effet minéralocorticoïde. A l'inverse, des cellules non-épithéliales telles que certains neurones, des cellules de la paroi artérielle et les cardiomyocytes présentent des récepteurs minéralocorticoïdes alors que ces cellules ne sont pas impliquées dans le transport unidirectionnel des ions. Dans les conditions habituelles, les hormones minéralocorticoïdes exercent un effet propre sur leur cellules cibles classiques grâce à plusieurs mécanismes qui leur assurent cette spécificité :

a) *Inactivation des glucocorticoïdes dans les cellules cibles des hormones minéralocorticoïdes*

Les cellules cibles des hormones minéralocorticoïdes sont exposées à un afflux important d'hormones glucocorticoïdes qui circulent à des concentrations mille fois plus élevées que l'aldostérone. Or le récepteur minéralocorticoïde a la même affinité *in vitro* pour les hormones minéralo- et glucocorticoïdes ce qui posait la question de la sélectivité du récepteur minéralocorticoïde *in vivo*. Il a été montré récemment que les glucocorticoïdes étaient inactivés par réduction de la fonction hydroxyle en position 11 grâce à une 11β -hydroxystéroïde déshydrogénase (11β -HSD). Deux enzymes existent, l'une hépatique (11β -HSD1) ayant une activité oxydoréductasique et une faible affinité pour les glucocorticoïdes. L'autre enzyme (11β -HSD2) a une affinité mille fois supérieure pour les glucocorticoïdes, utilise le NAD comme co-facteur et n'a qu'une activité oxydasique. Elle a été clonée récemment, notamment chez l'homme où elle est exprimée dans le placenta, le rein (tube contourné distal), le pancréas, le colon, l'ovaire et le testicule. Cette enzyme est colocalisée avec le récepteur minéralocorticoïde dans les tissus cibles de l'aldostérone.

La 11β -HSD2 empêcherait la liaison des glucocorticoïdes aux récepteurs minéralocorticoïdes en réduisant le cortisol en cortisone et la corticostérone en 11-déhydro-corticostérone. Fait intéressant, il existe une affection humaine dans laquelle cette enzyme pourrait être impliquée, le syndrome d'excès apparent de minéralocorticoïdes. Il s'agit de patients ayant une hypertension sévère familiale (maladie autosomale récessive avec hypokaliémie, rénine et aldostérone basses), caractérisée par une absence ou une anomalie de la conversion du cortisol en

cortisone alors que la réaction inverse est normale. Ces hypertensions sont curables par la dexaméthasone qui supprime la production des glucocorticoïdes qui occupent de façon illégitime les récepteurs minéralocorticoïdes. Il sera intéressant de voir si il existe un réarrangement ou des mutations sur le gène de la 11 β -HSD2. L'intoxication par l'acide glycyrrhétinique, le composé actif de la réglisse, produit un syndrome équivalent par inhibition de la 11 β -HSD2.

b) *Propriétés intrinsèques du récepteur minéralocorticoïde*

Le récepteur minéralocorticoïde fait partie de la sous-famille des récepteurs nucléaires de type glucocorticoïde. Il est exprimé dans le rein, le colon, les glandes salivaires, le cerveau, notamment au niveau de l'hippocampe. Il est aussi présent dans le cœur et les vaisseaux. Ce récepteur a une affinité (K_D) similaire pour l'aldostérone et le cortisol. Toutefois, les études de cinétique de dissociation des complexes du récepteur avec des stéroïdes tritiés ont montré une stabilité bien supérieure du complexe récepteur-aldostérone- [H] ³ par rapport à celle du complexe récepteur-cortisol- [H] ³. Cette propriété intrinsèque du récepteur favoriserait la rétention des minéralocorticoïdes sur leur récepteur et permettrait l'interaction du récepteur activé avec les éléments de reconnaissance des promoteurs.

c) *Interaction du récepteur minéralocorticoïde avec les éléments cis de reconnaissance des glucocorticoïdes (GRE). Intervention d'autres facteurs transcriptionnels*

Le récepteur activé par les hormones minéralocorticoïdes se lie à l'élément *cis* consensus de reconnaissance des glucocorticoïdes (glucocorticoid responsive element, GRE). Il est capable de transactiver un gène reporteur (luciférase, CAT) comportant cet élément de reconnaissance, de la même manière que les hormones glucocorticoïdes. Toutefois, ce schéma n'est plus valable lorsque l'on étudie un GRE composite (faisant intervenir d'autres éléments flanquants de reconnaissance du DNA) et non plus un GRE limité à la simple séquence consensus. D'autres facteurs transcriptionnels (*c-fos*, *c-jun*), peuvent intervenir avec le récepteur minéralo- ou glucocorticoïde pour moduler l'effet transcriptionnel. Ce dernier dépend alors de l'activation des récepteurs minéralo- ou glucocorticoïdes et de la concentration relative de *c-fos* et de *c-jun*. Un élément de spécificité supplémentaire pour l'action propre des récepteurs minéralocorticoïdes est donc possible à ce niveau. Il est enfin vraisemblable qu'existent des éléments spécifiques de reconnaissance des hormones minéralocorticoïdes (MRE) qui n'ont pas été identifiés jusqu'à présent.

Canal épithélial sodium sensible à l'amiloride

L'aldostérone agit en augmentant de façon rapide la perméabilité apicale au sodium des cellules épithéliales au niveau du canal épithélial sodium. Ces canaux ont une faible conductance unitaire (5 à 10 pS), un temps moyen d'ouverture

long (\geq à la seconde), une grande sélectivité vis-à-vis du lithium et du sodium, et sont bloqués par l'amiloride ou l'EIPA à 10^{-7} - 10^{-8} M. Par contre, ils sont peu sensibles au phénamil qui bloque préférentiellement l'échangeur sodium-proton. Un progrès important a été le clonage récent de ce canal par expression dans les œufs de xénope. Une première sous-unité α de ce canal a été clonée par le groupe de B. Rossier en 1993. Elle présentait une faible activité mais avait les caractéristiques attendues du canal épithélial sodium. Deux autres sous-unités ont été récemment clonées par le même groupe grâce à des expériences de complémentation de l'activité canal sodium codée par les ARNm issus de colon de rat dans les œufs de xénopes.

Les trois sous-unités α , β et γ ont environ 35 % d'homologie, présentent une importante sélectivité vis-à-vis du sodium et du lithium versus le potassium, une affinité de l'ordre de 10^{-8} M pour le benzamil. La sous-unité alpha possède 1 % de l'activité de l'ensemble des trois sous unités α , β , γ . Toutes ces sous-unités possèdent deux domaines transmembranaires permettant leur insertion dans la membrane plasmique, une région extracellulaire riche en cystéine et une courte extrémité N et C-terminale intracellulaire. Fait intéressant, ces protéines ont une homologie notable avec les dégénéérines, produits des gènes du nématode *C-elegans* et dont la mutation aboutit à la dégénérescence spécifique de motoneurones impliqués dans la transduction mécanique.

Les sous-unités α , β , γ sont exprimées dans le tube collecteur rénal cortical et médullaire, au niveau du colon et du poumon. L'étude de leur régulation au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel par les différents stéroïdes et notamment par l'aldostérone ne fait que débiter. Par contre, il est connu que l'activité du canal épithélial sodium peut être modifiée par des protéines G et des protéines du cytosquelette. Des expériences de patch clamp sur des cellules du tube collecteur rénal ont montré en effet que l'actine active le canal épithélial sodium alors que la filamine et la DNase I, qui agissent sur l'état de polymérisation des filaments d'actine, inhibent son activité.

Il existerait un équivalent du canal épithélial sodium sensible à l'amiloride au niveau des lymphocytes B humains transformés. Ce canal peut être modulé par une phosphorylation dépendante de l'AMP cyclique et par une protéine G sensible à la toxine de pertussis. Ces deux traitements séparés aboutissent à l'activation du canal mais ce dernier est inactivé lorsque la toxine cholérique et la toxine pertussique sont administrées simultanément. L'aldostérone ne semble pas agir, du moins en administration aiguë, sur la synthèse des sous-unités du canal. Elle pourrait par contre augmenter la probabilité d'ouverture d'un canal.

Canal épithélial sodium sensible à l'amiloride et pathologie humaine

Il existe une forme rare d'hypertension artérielle humaine due à une activation constitutive du canal épithélial sodium. Un syndrome décrit par Grant Liddle, il y a une trentaine d'années, se caractérise par une hypertension sévère, familiale,

autosomale dominante. Il existe une hypokaliémie, un effondrement des taux de rénine et d'aldostérone sans trouble de la biosynthèse ou du métabolisme des stéroïdes. Cette hypertension répond de façon très spécifique à l'administration de modamide, diurétique distal, mais est insensible à la dexaméthasone ou à la spironolactone, antagoniste de l'aldostérone au niveau du récepteur minéralocorticoïde. Il vient d'être montré qu'il existe une mutation de la partie C-terminale intracellulaire de la sous-unité β du canal épithélial sodium, coségrégant avec l'affection dans le pédigré originel décrit par Liddle. Il reste à savoir si d'autres hypertensions artérielles, apparemment essentielles et sensibles au sodium, pourraient être dues à un variant de l'une ou de l'autre des sous-unités du canal épithélial sodium.

Aldostérone et système cardiovasculaire

L'aldostérone agit sur le système cardiovasculaire de façon *indirecte* en favorisant la réabsorption de sodium et l'augmentation du volume extracellulaire au niveau rénal. Il est possible que l'aldostérone exerce aussi un effet *direct* sur ce système. La présence d'ARNm codant pour le récepteur minéralocorticoïde et la protéine réceptrice a été démontrée respectivement par hybridation *in situ* et immunohistochimie au niveau cardiaque et vasculaire. La biosynthèse d'aldostérone dans les cellules musculaires lisses vasculaires a même été récemment avancée, ce qui pourrait être la base d'un système autocrine.

Une série de travaux récents s'est intéressé à l'effet possible de l'aldostérone sur la fibrose interstitielle cardiaque. L'administration d'aldostérone pendant huit semaines chez le rat uninephrectomisé, en présence d'un régime riche en sodium, élève la pression artérielle, ce que ne font ni l'aldostérone en l'absence de régime riche en sodium ou un régime riche en sodium isolément. En outre, toujours *in vivo*, l'aldostérone augmente le taux de collagène interstitiel au niveau du cœur et des espaces périvasculaires, au niveau des artères coronaires intramyocardiques. Ces effets de l'aldostérone semblent spécifiques car ils ne sont pas reproduits par l'administration de corticostérone et sont inhibés par des antialdostérone. La démonstration d'un effet direct nécessite néanmoins que soit trouvée une synthèse de collagène *in vitro* sur des cardiomyocytes ou des fibroblastes cardiaques, ce qui est actuellement débattu. L'hypothèse attrayante d'un effet direct de l'aldostérone, génomique ou non, sur d'autres cellules que les cellules épithéliales reste donc à démontrer.

RAPPORT D'ACTIVITÉ DU LABORATOIRE

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

Equipe : F. SOUBRIER, T.A. WILLIAMS, A.-M. HOUOT, S. NADAUD, E. VILLARD, A. BONNARDEAUX (départ en juillet 1994), M.-C. ZENNARO, T. NABIKA (départ en septembre 1994), I. FERY, C. TOURNOIS

*A - Biologie et génétique moléculaire de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA)**1 - Rats transgéniques pour le gène de l'ECA humaine*

Ce programme est réalisé en collaboration avec John Mullins à Edinburgh. Après l'échec des premières injections, une nouvelle série d'injection du gène entier est en cours de criblage. En outre, une construction permettant le ciblage de l'expression dans le cœur a été réalisée et sera injectée dans un avenir proche (E. Villard, C. Tournois).

2 - Effet du polymorphisme du gène de l'ECA sur la concentration d'ECA dans le plasma

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 du gène. Le séquençage de plusieurs kilobases a été réalisé chez plusieurs sujets en fonction de leurs génotypes pour le polymorphisme de l'ECA. De nombreux polymorphismes ont été mis en évidence dans la région codante du gène ainsi que dans les régions régulatrices. L'analyse est en cours (E. Villard, A.-M. Houot).

3 - Expression in vitro de l'ECA de drosophile

Nous avons exprimé l'ECA de drosophile dans baculovirus et dans la levure *Pichia Pastoris*. C'est dans la levure que l'expression est la plus forte et devrait permettre une production suffisante pour la cristallisation de l'enzyme et son étude par diffraction aux rayons X (T. Williams).

B - *Gène de l'enzyme endothéliale humaine de synthèse du monoxyde d'azote (NO)*

Nous avons mis au point la RT-PCR quantitative des trois isoformes (endothéliale, neuronale et inductible) de la synthèse du NO. Cela nous a permis de mesurer l'expression du gène dans différents modèles expérimentaux où les NO synthases ont pu être impliquées, notamment l'augmentation des forces de cisaillement par fistule aorto-cave et la surcharge hydrosodée par administration de minéralocorticoïdes et de NaCl chez le rat (S. Nadaud).

C - *Contrôle génétique de la pression artérielle*

1 - *Gènes candidats et hypertension artérielle*

Plusieurs études sont actuellement en cours sur des gènes candidats pour l'hypertension familiale tels que l'aldostérone synthase (CYPB2), la sous-unité bêta du canal sodium épithélial et la 11-bêta hydroxystéroïde déshydrogénase. Ces études sont rendues possibles par l'identification de marqueurs hautement polymorphes au sein de chacun de ces gènes (L. Pascoe, I. Fery).

2 - *Génétique moléculaire du gène du récepteur minéralocorticoïde*

Nous avons déterminé la structure du gène humain et étudié son expression. Nous avons identifié deux promoteurs au sein de ce gène. L'identification d'une séquence de type microsatellite au sein du gène permettra l'exploration de ce gène dans les familles hypertendues (M.-C. Zennaro).

II. *ÉTUDE DES RAPPORTS STRUCTURE-FONCTIONS DES RÉCEPTEURS MEMBRANAIRES DE L'ANGIOTENSINE II, DE LA VASOPRESSINE ET DE L'INSULINE*

Equipe : E. CLAUSER, C. MONNOT, C. AUZAN, S. CONCHON, K. CURNOW, B. TEUTSCH

L'activité du groupe au cours de l'année 1994-95 a porté sur l'analyse du fonctionnement moléculaire des récepteurs de l'angiotensine II et de la vasopressine. 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).

A - *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 diffé-

rents groupes au cours des 2 dernières années. Grâce aux ADNc de ces récepteurs (offerts ou recloneés au laboratoire), nous avons entrepris l'expression de ces récepteurs recombinants sauvages ou mutés, afin de préciser les domaines structuraux impliqués dans leurs spécificités pharmacologiques et/ou leurs voies de signalisation. De plus la structure normale du gène de l'AT1 humain a été approfondie et la recherche de variants en pathologie humaine entreprise.

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

Ces mutations soit abolissent la liaison de l'angiotensine II (Lys₁₀₂ et Lys₁₉₉), soit ne modifient pas le fonctionnement du récepteur (Ser₁₀₅, 107 ou 109), soit enfin modifient la liaison du Dup753 mais pas celle de l'angiotensine II (Asn₁₁₁ et Ser₁₁₅) (C. Monnot et al. soumis). Cette étude a permis de confirmer que les sites de liaison de l'AngII et des antagonistes non peptidiques étaient différents et intéressaient respectivement des domaines extracellulaires ou transmembranaires du récepteur. Cette étude identifie aussi pour la première fois un phénomène de complémentation protéique, la formation de dimères protéiques entre deux mutants défectifs pour la liaison permettant de reconstituer un site de liaison pour l'AngII après cotransfection.

2) *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.

- La pharmacologie et la signalisation intracellulaire (production d'inositol phosphates et mobilisation du calcium intracellulaire) des récepteurs AT1a et AT1b ne présentent pas de différences significatives. Cependant seul le récepteur AT1a est capable de transmettre l'effet mitogénique de l'AII (B. Teutsch et al., en préparation).

- 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 les protéines kinases C et le calcium mais pas les voies de l'AMP cyclique et de l'acide arachidonique (B. Teutsch et al., en préparation).

3) *Les déterminants moléculaires responsables de l'internalisation du récepteur AT1a* ont été plus spécifiquement étudiés par délétions progressives de la séquence carboxy-terminale de ce récepteur. Les récepteurs délétés ont été exprimés de façon stable dans CHO et leur signalisation et internalisation ont été

analysées. Cette étude a permis d'identifier une séquence distale sur le segment carboxyterminal dont la délétion supprime l'internalisation. Ce mutant présente cependant une signalisation normale voire amplifiée par rapport au récepteur sauvage, conséquence probable de l'absence de désensibilisation de ce mutant (S. Conchon et al. en préparation).

4) *Les déterminants moléculaires responsables de l'absence de couplage aux protéines G* du récepteur AT2 et les mutations susceptibles d'activer de façon constitutive le récepteur AT1 ont été recherchés par mutagénèse ou production de récepteurs chimériques modifiant la troisième boucle intracellulaire du récepteur AT1a. La caractérisation des lignées surexprimant ces récepteurs mutants est en cours.

5) *Enfin, la structure du gène du récepteur AT1 humain a été approfondie.* Ce gène se compose de 5 exons dont les 4 premiers codent pour la région 5' non traduite de l'ARNmessenger, alors que le 5^e code pour l'essentiel de la protéine. Plusieurs observations intéressantes sont à souligner (K. Curnow et al. sous presse) : a) Les exons 2, 3 et 4 font l'objet d'un épissage alternatif et la distribution des différents ARNm en résultant a été étudiée par PCR. b) Les 2 premiers exons exercent un effet inhibiteur sur la traduction, dont le mécanisme a été étudié. c) La présence de l'exon 3 pourrait donner naissance à un nouveau récepteur AT1 présentant une extension amino-terminale de sa séquence.

Des modifications de la séquence codante 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 et a été démontrée pour les adénomes thyroïdiens hypersécrétants et le récepteur TSH. Malheureusement aucune mutation n'a été trouvée dans la séquence du récepteur AT1 (E. Davies et al., en préparation).

B - Récepteurs de la vasopressine

Après avoir cloné et caractérisé avec M. Thibonnier (CWRU, Cleveland, OH, USA) l'ADNc et le gène du récepteur humain V1a, nous avons cloné avec X. Bertagna (Endocrinologie, Hôpital Cochin) l'ADNc du récepteur humain V1b, dont nous avons caractérisé la pharmacologie, la signalisation et la distribution tissulaire. Nous avons ensuite montré que l'expression de ce récepteur dans les tumeurs hypophysaires et dans des tumeurs à sécrétion ectopique d'ACTH, était fortement corrélée à l'expression du phénotype corticotrope.

C - Récepteur de l'insuline

L'analyse des rapports structure-fonction du récepteur de l'insuline s'est poursuivie dans 2 directions :

1) *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'acquiescer une spécificité serine kinase (I. Leconte et E. Clauser, soumis).

2) *Enfin, le rôle du domaine transmembranaire du récepteur* dans la transmission du signal est en cours d'étude avec 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'ANGIOTENSINE (ECA)

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

Ce groupe a comme thème de recherches l'enzyme de conversion de l'angiotensine I ou ECA. Deux projets correspondent à deux aspects différents de cette protéine :

1) L'ECA est une protéine membranaire de type I c'est-à-dire ancrée dans la membrane plasmique par une courte séquence hydrophobe, localisée près de l'extrémité C-terminale de la molécule. Cette enzyme a une contre partie soluble qui conserve uniquement le domaine N-terminal extracellulaire mais qui possède toutes les propriétés enzymatiques de la forme ancrée. Le mécanisme de libération de la forme circulante est étudié dans le cas de l'ECA humaine et dans le cas de l'ECA de cobaye.

2) L'ECA est une dicarboxypeptidase qui sous sa forme somatique a la particularité de posséder deux sites actifs fonctionnels présentant la séquence consensus HEXXH des métalloprotéases à zinc du type thermolysine (gluzincines). Les deux sites actifs ont une homologie de séquence primaire de 80 % et partagent la partie extracellulaire de la protéine en deux domaines homologues. Nous recherchons, actuellement la spécificité de chacun des sites actifs vis à vis de substrats particuliers, notre objectif étant de déterminer l'existence de substrats strictement hydrolysés par un seul des deux sites, ceci permettant l'approche du rôle respectif du site N-terminal et celui de l'ECA testiculaire qui a conservé uniquement le site actif C-terminal.

A - Solubilisation de l'ECA endothéliale

1 - Système cellules CHO

La solubilisation de la forme membranaire correspondant à l'ECA endothéliale humaine est étudiée dans une lignée de CHO transfectée par le cDNA correspondant à l'ECA endothéliale et comparée à celle de lignées transfectées soit par le cDNA correspondant au domaine C-terminal de l'ECA soit par le cDNA de l'ECA soluble par construction (délétion de la partie transmembranaire et cytosolique de la protéine) afin de voir le rôle joué par le domaine N-terminal ou la zone d'ancrage au cours du processus de protéolyse.

La biosynthèse de ces protéines et les cinétiques de libération des formes solubles de ces trois protéines recombinantes sont étudiées par marquage métabolique des cellules CHO transfectées par des aminoacides marqués au soufre 35. 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 solubilisée dans le milieu de culture à partir de la membrane plasmique pour les deux lignées recombinantes ayant conservé la partie transmembranaire et cytosolique de l'ECA. L'apparition des molécules marquées à la surface plasmique est accélérée (4h au lieu de 16h) pour la lignée transfectée par le cDNA correspondant au domaine C-terminal de l'ECA, indiquant une biosynthèse plus rapide. D'autre part la protéine correspondant au domaine C-terminal est libérée 10 fois plus vite dans le milieu en une heure, ce qui indique un rôle du domaine N-terminal dans ce mécanisme de solubilisation. De plus cette solubilisation est, dans ce système CHO augmentée (2,4 fois) pour les deux protéines par les phorbols esters mais est insensible à l'action des ionophores, ce qui semblerait impliquer, dans ce processus de protéolyse, la participation d'une protéine kinase C indépendante des ions calcium. Par contre le mutant soluble par construction n'est pas retenu à la membrane et apparait, dans le milieu de culture, sans délai important et sans protéolyse dans la séquence C-terminale. Ceci démontre la nécessité de l'ancrage à la membrane pour le processus de protéolyse et localise l'enzyme responsable (sécrétase) au niveau de la même membrane.

Afin de déterminer la localisation du site de clivage sur la séquence C-terminale de ces protéines où se situe la protéolyse responsable de la libération des formes solubles, les extrémités C-terminales des formes solubles sont identifiées par des approches biochimiques et immunologiques. Pour l'ECA endothéliale solubilisée recombinante la séquence AGQR identifiée, localisée au niveau de l'arginine 1137 de la séquence de la protéine, permet de situer le site de clivage entre l'arginine 1137 et la leucine 1138. Par contre pour la protéine solubilisée recombinante correspondant au domaine C-terminal le site de clivage est localisé entre l'arginine 1227 et la valine 1228, très près de la pièce hydrophobe assurant l'ancrage à la membrane plasmique. La mise en évidence de deux sites de clivage n'est pas incompatible avec la présence d'une seule sécrétase qui suivant

la conformation de son substrat utilise un site alternatif de clivage. Nous avons précédemment montré que la mutation de l'arginine 1137 en glutamine n'altère pas la protéolyse, ce qui peut laisser supposer que la sécrétase n'a pas une spécificité très stricte vis à vis du site de clivage.

Dans le système CHO, le domaine N-terminal de l'ECA exerce une action inhibitrice conformationnelle par interaction au niveau de la membrane plasmique avec la région où se situe le site de clivage 1227-1228 et sans doute avec la sécrétase elle-même ancrée sur la membrane. En absence du domaine N-terminal le site 1227-1228 devenu accessible, serait préférentiellement choisi par la sécrétase.

2 - *Système cellule endothéliale*

La forme plasmatique a une extrémité C-terminale identique à celle de la forme sécrétée dans la cellule CHO transfectée, ce qui laisse supposer un mécanisme protéolytique de même type au niveau de la cellule endothéliale humaine. Nous devons vérifier cette hypothèse. Dans cette intention, des cellules endothéliales de cordon ombélicale humain spontanément immortalisées (ECV 304) sont transfectées par le cDNA correspondant à la forme somatique et la biosynthèse et la libération de la forme soluble sont à l'étude.

3 - *ECA de cobaye*

L'activité plasmatique de l'ECA est chez le cobaye 12 fois supérieure à celle du plasma humain. L'activité spécifique étant du même ordre que celle déterminée pour l'ECA soluble humaine et d'autre part les quantités d'ECA pulmonaire par unité de poids de poumon étant comparables chez les deux espèces, on ne peut imputer le taux élevé chez le cobaye ni à une ECA ayant des propriétés catalytiques différentes ni à une augmentation du taux de la protéine au niveau pulmonaire. Pour expliquer ce taux élevé nous recherchons, d'une part l'existence d'un épissage en 3' des pré-messagers de l'ECA endothéliale, conduisant à la formation d'une protéine tronquée de son domaine transmembranaire et cytosolique et d'autre part l'existence de déterminants dans la séquence de l'ECA de cobaye susceptibles d'augmenter ce processus de solubilisation. Le clonage de l'ECA de cobaye est actuellement en cours. Les cellules de CHO seront transfectées avec ce cDNA codant pour l'ECA de cobaye afin de comparer dans un système identique la biosynthèse et la solubilisation à celle de l'ECA humaine.

B - *Différences enzymatiques des deux sites actifs de l'ECA*

1 - *Spécificité vis-à-vis du peptide Ac-Ser-Asp-Lys-Pro*

La dégradation du peptide hémorégulateur NAcSer-Asp-Lys-Pro (AcSDKP) qui exerce une régulation négative sur la prolifération des cellules hématopoïé-

tiques semble dans le plasma être due à l'action initiale de l'ECA par libération du dipeptide KP. 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 (ECA sauvage, ECA muté sur les deux histidines du site actif N-terminal ou du site actif C-terminal). Les deux sites actifs présentent vis à vis de ce peptide des affinités du même ordre que celles de l'angiotensine I, les Km étant voisins de 40 nM mais le site actif N-terminal hydrolyse le peptide 50 fois plus vite que le site C-terminal avec des valeurs de K_{cat}/K_m respectivement de 0,5 et 0,01 $\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Le rôle prépondérant du site actif N-terminal dans l'hydrolyse du peptide AcSDKP est confirmé par l'inhibition de l'hydrolyse par incubation avec un anticorps monoclonal spécifiquement dirigé contre le site actif N-terminal. Pour la première fois un substrat hautement spécifique du domaine N-terminal avec des constantes cinétiques de l'ordre de celles des substrats naturels déjà identifiés a pu être mis en évidence. Via son site actif N-terminal, l'ECA pourrait « in vivo » intervenir dans la régulation de la concentration locale de ce peptide hémorégulateur.

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

Les trois enzymes recombinantes décrites ci-dessus 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. Nous étudions actuellement 5 substrats : 2 naturels (angiotensine I et AcSDKP) et 3 substrats synthétiques (Hip-His-Leu, Hip-Ala-Pro, Hip-Lys-Pro) qui sont différemment hydrolysés par les deux sites actifs une série d'inhibiteurs afin de déterminer leur spécificité vis-à-vis des deux sites actifs et leur efficacité vis-à-vis de substrats différents.

IV - ÉTUDE ET CARACTÉRISATION DE L'EXPRESSION DES GÈNES IMPLIQUÉS DANS LA PHYSIOLOGIE ET LA PATHOLOGIE CARDIOVASCULAIRE

Equipe : F. PINET, S. GIRARDIN (départ en novembre 1994), S. GERMAIN, S. FUCHS, J. PHILIPPE, J.M. LE MOULLEC, P. KORTH, K. MAURY, T. KONOSHITA (départ en septembre 1994)

Le travail de ce groupe s'articule autour de deux thèmes de recherche concernant des gènes impliqués dans la physiologie et la pathologie cardio-vasculaire.

A - Régulation de la transcription du gène de la rénine humaine

1 - Régulation du taux de mRNA de la rénine

Pour déterminer le (s) facteur (s) permettant une expression spécifique du gène de la rénine humaine, différents modèles sont nécessaires : des modèles *ex vivo* de culture cellulaire et des modèles *in vivo* d'animaux transgéniques. La régulation du mRNA a été étudiée chez la souris, le rat et l'homme grâce à la mise au point de la RT/PCR quantitative. Dans le cas de culture primaire de cellules juxtaglomérulaires (JG) de souris, le mRNA est détecté à partir de 5000 cellules et la technique est suffisamment sensible pour détecter le mRNA après une heure de culture. Nous avons montré que l'AMPc et le NO sont des stimulateurs et le calcium un inhibiteur du taux de mRNA rénine en culture de cellules JG. Chez l'homme, une synergie des esters de phorbol et de la forskoline a été observée sur l'élévation du taux de mRNA rénine ainsi que sur la production de rénine par les cellules chorioniques en culture.

2 - Etude fonctionnelle du promoteur de la rénine humaine

Le modèle de culture primaire de JG a permis de faire une analyse fonctionnelle du promoteur humain de la rénine par transfection transitoire de constructions associant la région 5' du gène de la rénine et un gène reporteur, la luciférase. Les 153 premières paires de bases du promoteur sont suffisantes pour obtenir une expression du gène de la rénine *ex vivo*. Par empreinte à la DNase I, cinq séquences ont été identifiées par homologie : ARP-1 (-259/-245), CRE (-234/-214), Pit-1 (-79/-62) et Ets (-29/-6). L'analyse par transfection et gel retard (caractérisation des interactions ADN/protéines) de la régulation par l'AMPc du gène de la rénine laissent supposer que le facteur CREB (se liant sur le CRE) et un facteur différent de Pit-1 (se liant sur le motif Pit-1) agissent de concert pour conférer une réponse à l'AMPc complète. Le clonage du facteur se liant sur le motif Pit-1 du promoteur de la rénine est en cours et une banque d'expression a été préparée à partir d'ARN polyA⁺ de cellules chorioniques. Cette banque sera criblée avec des sondes reproduisant 5 fois le motif Pit-1. La détermination des sites d'hypersensibilité à la DNase I (régions d'ADN dépourvues de chromatine et accessibles à des facteurs nucléaires de transcription) est en cours au laboratoire. Elle servira à l'approche *in vivo* de transgénèse pour déterminer les facteurs tissu-spécifiques qui gouvernent l'expression du gène de la rénine *in vivo*. Les transgènes utilisés comprendront les régions régulatrices du gène de la rénine (déterminées *ex vivo* et *in vitro*) associées à un gène reporteur, la luciférase (pour la sensibilité) et/ou Lac Z (pour la localisation cellulaire par immunohistochimie).

B - Etudes préliminaires du gène de l'enzyme de conversion de l'endothéline humaine

L'étude de la structure/fonction de l'enzyme de conversion de l'endothéline (ECE) sera effectuée afin d'acquies une meilleure connaissance de cet enzyme

qui convertit la « big endothéline », peptide quasi inactif, en un puissant vasoconstricteur, l'endothéline-1. Nous avons cloné une des deux isoformes de l'ECE (ECE_b) à partir des cellules HUVEC tandis que l'isoforme ECE_a a été cloné à partir des cellules ECV304. L'expression des deux isoformes est en cours dans les cellules CHO et celle de la forme soluble (dépourvue en domaine d'ancrage à la membrane par mutagenèse dirigée) sera réalisée dans le levure *Pichia Pastoris*. L'ECE fait partie de la famille des gluzincines et contient le motif consensus HEXXH. Nous déterminerons les acides aminés impliqués dans l'activité catalytique de l'enzyme, sa spécificité de substrat, l'expression et la régulation différentielle dans différents tissus et cellules vasculaires et finalement son implication en physiopathologie cardiovasculaire.

V - SYSTÈME RÉNINE-ANGIOTENSINE ET DÉVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE.

Equipe : J.M. GASC, S. SHANMUGAM (départ janvier 1995), M. SIBONY, H. KEMPF, S. SCHUTZ (départ Mai 1995), M-T. MORIN, F. MONGIAT

Les deux types connus de récepteur de l'angiotensine II (AT_1 et AT_2) sont exprimés dès avant la naissance dans le fœtus mais avec une distribution cellulaire particulière pour chacun d'eux. Ainsi, le récepteur AT_1 est présent dans le rein, principalement dans des cellules mésenchymateuses qui vont coloniser le glomérule et qui se différencieront ensuite en cellules mésangiales. Le récepteur AT_2 est beaucoup plus exprimé que l' AT_1 et sa distribution tissulaire et cellulaire dans le fœtus ne semble pas correspondre aux fonctions hormonales connues de l'angiotensine II dans l'animal adulte, c'est à dire la régulation de l'équilibre hydrominéral et de la pression artérielle. Par exemple, le récepteur AT_2 est présent dans le rein fœtal, dans des cellules mésenchymateuses indifférenciées, mais il disparaît simultanément à la différenciation fonctionnelle et histologique des néphrons. Ces résultats antérieurs ont conduit à proposer que l'activation de l'un et/ou l'autre des deux types de récepteur de l'angiotensine II pourrait jouer un rôle dans la croissance et l'organogénèse du rein et des autres tissus et organes qui expriment ces récepteurs.

Partant de ces observations le travail a été poursuivi dans plusieurs directions. D'une part, une étude de l'ontogénèse précoce des récepteurs dans le fœtus de rat et une étude détaillée de la régulation spatio-temporelle des deux récepteurs dans des systèmes où l'angiotensine II joue un rôle central (rein, surrénale, coeur et vaisseaux) ont été réalisées. D'autre part une étude semblable a été entreprise sur l'embryon et le fœtus humain pour vérifier si l'on peut transposer le rôle éventuel de ces récepteurs au cours du développement embryonnaire du modèle animal du rat à l'homme.

Le fœtus de rat reste un modèle expérimental peu commode pour étudier les effets d'une activation ou d'un blocage des récepteurs de l'angiotensine II. C'est

pourquoi, dans le but d'utiliser l'embryon de poulet comme modèle expérimental pour étudier le rôle de l'angiotensine II dans l'organogénèse, un travail de clonage d'un récepteur de l'angiotensine II a été entrepris.

L'internalisation des récepteurs membranaires est un processus de régulation du nombre de récepteurs disponibles à la membrane plasmique. Un travail en cours vise à décrire, à l'échelon ultrastructural, l'internalisation des récepteurs de l'angiotensine II et à révéler l'existence éventuelle d'un transfert de ces récepteurs vers le noyau de la cellule.

Bien que le rôle du système rénine-angiotensine dans la reproduction ne soit pas établi, la très forte expression de l'enzyme de conversion de l'angiotensine I (ECA) dans le testicule et l'ovaire et du récepteur AT₂ dans l'ovaire nous a conduit à étudier leur régulation dans diverses conditions physiologiques normales au cours de la vie.

A - Ontogénèse précoce des récepteurs de l'angiotensine II

Par hybridation *in situ* nous avons montré la première apparition de l'ARN messager (ARNm) du récepteur AT₂ dans un double cordon de cellules longeant symétriquement l'aorte dans la région thoracique. A 11 jours de gestation (E11) ce cordon ne dépasse pas 2-3 cellules en coupe transversale. A E12 il s'est étendu vers la partie caudale du fœtus et est devenu plus épais. De plus, d'autres cellules expriment alors l'ARNm du récepteur AT₂ : des cellules isolées dans le mésentère en direction du tube digestif et des massifs de cellules mésenchymateuses dans le mesonephros et le myotome. Un jour plus tard, à E13, le cordon para-aortique est plus épais et métamérisé et les cellules mésenchymateuses sont encore plus nombreuses et distribuées plus largement dans le fœtus. Nous avons montré que les cellules de la chaîne para-aortique contiennent de la tyrosine hydroxylase et qu'il s'agit donc probablement de la chaîne ganglionnaire sympathique. Ce ne sont plus seulement les cellules du myotome qui expriment l'ARNm du récepteur AT₂ mais de nombreux massifs de cellules condensées qui se différencieront ultérieurement en muscles striés (langue, membre, arcs branchiaux, etc.) ou en cartilage (cage thoracique). Une cartographie précise de ces cellules est en préparation.

L'ARNm du récepteur AT₁ apparaît seulement à E13 où un signal très faible d'hybridation est discernable dans le myotome ainsi que dans certains mésenchymes moins bien identifiables que ceux exprimant le récepteur AT₂.

B - Régulation spatio-temporelle des récepteurs AT₁ et AT₂ du fœtus à l'adulte

Le travail sur les variations de l'expression des récepteurs au cours du développement fœtal et post-natal a été poursuivi. Nous avons particulièrement étudié le rein et la surrénale d'une part, et le cœur, le poumon et les gros troncs artériels, d'autre part.

Dès 15 jours de gestation dans le rein, les premiers glomérules différenciés sont visibles. L'ARNm du récepteur AT₁ est détecté dans les cellules mésangiales,

tandis que le récepteur AT2 n'est déjà plus détectable dans les glomérules prêts à fonctionner. Cependant, dans le cortex néphrogène, où de nouveaux glomérules se forment jusqu'à une ou deux semaines après la naissance, l'ARNm de récepteur AT2 reste fortement exprimé dans le mésenchyme jusqu'au moment où il se condense pour former le blastème qui subira la trans-différenciation mésenchymo-épithéliale. Aucune structure épithéliale n'exprime le récepteur AT2 dans le rein. Dans le même temps les cellules mésenchymateuses exprimant le récepteur AT1 colonisent les glomérules en formation (appelés « comma-shaped » et « S-shaped bodies ») pour former le mesangium où AT1 sera exprimé sans interruption jusqu'à l'âge adulte. En fait, les deux types de récepteurs ont une régulation inverse l'un de l'autre : AT1 augmente en intensité et en aire de distribution au cours du développement pré- et post-natal, tandis que AT2 regresse en intensité et en aire de distribution, parallèlement à la maturation fonctionnelle du cortex puis de la medulla du rein. C'est ainsi que l'ARNm de AT2 n'est plus détectable dans le rein 22 jours après la naissance.

La régulation de l'expression des ARNm des récepteurs AT1 et AT2 est très différente dans la surrénale et dans le rein. Dans la surrénale les deux récepteurs apparaissent simultanément dans la zone glomérulée du cortex, puis dans la zone médullaire lorsque les cellules dérivées des crêtes neurales colonisent la surrénale. Mais, contrairement au rein où le récepteur AT2 s'effondre après la naissance jusqu'à n'être plus détectable à 3 semaines après la naissance, dans la surrénale le récepteur AT2 continue d'être exprimé dans la zone glomérulée et la medulla, y compris chez l'adulte. On est donc en présence de deux mécanismes de régulation très différents dans le rein et la surrénale, qui sont deux des principaux organes cibles de l'angiotensine II.

C - Ontogénèse du système rénine-angiotensine dans l'embryon et le fœtus humain

Les agents bloquant le système rénine-angiotensine à différents niveaux sont de plus en plus utilisés dans le traitement de l'hypertension artérielle. En particulier, des antagonistes du récepteur AT1 sont déjà disponibles pour le traitement de l'hypertension et il est donc important de savoir dans quelle mesure, et à partir de quel stade de la grossesse, le développement du fœtus pourrait être affecté par un tel traitement à la mère. D'autre part, la compréhension des rôles éventuels de l'angiotensine II comme facteur de croissance et de différenciation au cours du développement, requerrait de vérifier sur l'homme les observations faites précédemment sur le fœtus de rat.

Le travail en cours fait apparaître déjà que tous les composants du système rénine-angiotensine (angiotensinogène, rénine, enzyme de conversion et les deux types de récepteurs) sont exprimés très tôt dans le développement (à partir de la 8^e semaine). Pourtant il existe des différences avec le rat puisque nous n'avons pas pu mettre en évidence l'expression du récepteur AT2 dans la medulla de la surrénale humaine fœtale alors que ce tissu exprime très fortement ce récepteur dans le fœtus comme chez le rat adulte.

Cette étude systématique se poursuit actuellement pour obtenir une cartographie complète de la distribution de tous les composants du système rénine-angiotensine depuis 3-4 semaines de grossesse jusqu'à la naissance.

D - Clonage du récepteur de l'angiotensine II de poulet

L'abondance, la distribution et la régulation des récepteurs de l'angiotensine II pendant le développement fœtal constituent des arguments en faveur d'un rôle de l'angiotensine II dans le fœtus, rôle probablement différent de ses fonctions hormonales dans l'animal adulte. La difficulté de l'expérimentation animale sur le fœtus de rat, à cause de l'interférence maternelle, nous a conduit à considérer l'embryon de poulet comme un modèle convenable pour montrer et analyser le(s) rôle(s) de l'angiotensine II au cours du développement embryonnaire. Les oiseaux et les mammifères ont un système rénine-angiotensine comparable, et un développement embryonnaire suffisamment proche pour pouvoir utiliser le poulet comme modèle expérimental.

Cette étude a commencé par le clonage et le séquençage d'un récepteur de l'angiotensine II à partir d'ARN de surrénale de poulet. Ce récepteur est très proche par sa séquence de celui de la dinde qui a déjà été publié, et assez proche du récepteur AT1 de rat. Il s'agit d'un récepteur à 7 domaines trans-membranaires, vraisemblablement couplé aux protéines G. Sa distribution a été étudiée par hybridation *in situ* chez l'adulte et elle ne correspond pas exactement à celle de l'AT1 ou de l'AT2 chez le rat. Une différence remarquable avec le récepteur AT1 de mammifères est l'expression du récepteur de l'angiotensine de poulet (ATp) dans les cellules endothéliales, et non pas dans les cellules musculaires vasculaires lisses comme l'AT1 de rat. Cette différence est intéressante car il avait été démontré que l'angiotensine II chez le poulet exerce un effet vasodilatateur immédiat, contrairement aux mammifères où l'angiotensine II a un effet vasoconstricteur. Cet effet vasodilatateur pourrait passer par la production par les cellules endothéliales de monoxyde d'azote qui produirait le relâchement des muscles de la paroi artérielle. Cette étude se poursuivra par la mise en évidence des propriétés pharmacologiques du récepteur ATp cloné, et éventuellement le clonage d'un second récepteur s'il y a des arguments en faveur de l'existence d'un tel récepteur.

Ce travail de clonage et caractérisation du (ou des) récepteurs de l'angiotensine II de poulet servira de base à l'étude expérimentale visant à démontrer que l'angiotensine II exerce effectivement un rôle sur la croissance et/ou la différenciation au cours du développement embryonnaire.

E - Système rénine-angiotensine et reproduction

Après avoir montré la très forte expression de l'enzyme de conversion de l'angiotensine I (ECA) dans les cellules germinales mâles post-meiotiques (spermatozoïdes et spermatozoïdes) il n'a pas été possible de montrer la présence de

récepteurs de l'angiotensine II. Il semblait donc que l'absence du composant effecteur du système renine-angiotensine à l'intérieur des tubes seminifères rendait très improbable un rôle physiologique de l'ECA dans la reproduction. Pourtant, des publications très récentes rapportent que des souris où le gène de l'ECA a été inactivé par recombinaison homologue sont stériles. Cela conduit à envisager un autre rôle indépendant de l'angiotensine puisque ses récepteurs ne sont pas exprimés. Ce rôle pourrait être la maturation d'un substrat autre que l'angiotensine I. C'est dans cette direction que cette question sera réexaminée.

Dans l'ovaire l'ECA est fortement exprimé dans les cellules de la granulosa des follicules en voie d'atrésie. Le récepteur AT2 y est aussi fortement exprimé et une hypothèse avait même été proposée où l'angiotensine II était un facteur nécessaire au déclenchement de l'ovulation. Nous avons entrepris une étude détaillée pour rechercher si les mêmes follicules et les mêmes cellules expriment l'ECA et le récepteur AT2. Si tel était le cas, il existerait un argument en faveur d'un système rénine-angiotensine local qui pourrait avoir une fonction dans la reproduction. Dans un premier temps nous examinons l'expression du récepteur AT2 et de l'ECA dans diverses conditions physiologiques naturelles (maturation sexuelle, cycle ovarien et gestation) pour établir les bases d'une éventuelle régulation endocrinienne.

VI - ÉTUDE DE L'ACTIVITÉ ET DU RÔLE FONCTIONNEL DES NEURONES ANGIOTENSINERGQUES : MÉTABOLISME ET RÉCEPTEUR.

Equipe : C. LLORENS-CORTES, S. ZINI, Z. LENKEI, G. VAZEUX, P. MASDEHORS, N. DE MOTTA, A. HUS-CITHAREL

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

A - Ectoenzymes et métabolisme de l'AngII et de l'AngIII cérébrales

1) *Etude du rapport structure/fonction de l'aminopeptidase A par mutagenèse dirigée et expression dans les cellules eucaryotes*

a) *Etude des acides aminés, du site actif de l'APA essentiels pour l'activité catalytique et la liaison de l'ion zinc*

L'aminopeptidase A (EC 3.4.11.7.APA) est une glycoprotéine membranaire homodimérique de type II, qui appartient à la famille des métalloprotéases à

zinc. Elle hydrolyse les peptides tel que l'angiotensine II ou la cholécystokinine-8, par clivage des acides aminés glutamyl et aspartyl des extrémités N-terminales. La séquence primaire de l'APA comporte la séquence consensus HEXXH des métalloprotéases à zinc dont le modèle de référence est la thermolysine (gluzincines). L'étude cristallographique de celle-ci a permis de montrer que les deux histidines du motif sont deux des trois ligands du zinc, et que le glutamate est impliqué dans l'acte catalytique. En outre, le troisième ligand du zinc est un glutamate situé, suivant les peptidases, à une distance variable de la séquence consensus. L'alignement de séquence du site actif de l'APA avec celles d'autres métalloprotéases à zinc montre que plusieurs résidus sont conservés, notamment l'acide glutamique (Glu386) présent entre les deux histidines et un glutamate situé en aval du motif en position 408.

Afin de déterminer si les deux glutamates 386 et 408 sont impliqués respectivement dans la catalyse et dans la liaison du zinc, nous avons substitué par mutagenèse dirigée ces acides aminés par un résidu hydrophobe, une alanine (Ala386, Ala408), ou un résidu qui conserve la charge négative du glutamate, un aspartate (Asp386, Asp408). Après transfection des ADNc mutés sous contrôle du promoteur de SV40 dans des cellules COS-7, les mutants Ala386 et Asp386 ne présentent aucune activité enzymatique. Le mutant Ala408 s'est avéré également inactif. Par contre, lorsque la charge négative est conservée (Asp408), ce mutant présente une faible activité et un Km similaire à celui de l'enzyme non mutée. Afin d'estimer la présence du zinc dans les différents mutants, nous avons effectué un marquage métabolique des cellules transfectées avec l'isotope Zn-65, suivi d'une immunoprécipitation des protéines mutées à l'aide d'un anticorps spécifique anti-APA. Ces expériences montrent que la capacité de liaison du zinc est conservée pour le mutant Ala386, contrairement à Ala408 qui est incapable d'incorporer l'isotope.

Ces résultats indiquent que le Glu408 est le troisième ligand du zinc de l'APA, confirment l'implication présumée du Glu386 dans le processus catalytique et suggèrent pour l'APA un mécanisme catalytique similaire à celui d'autres métalloprotéases décrites auparavant (comme la thermolysine).

b) *Projets en cours*

Nous voulons explorer, par une approche analogue, l'implication de certains acides aminés du site actif de l'APA, dans la liaison de l'extrémité NH_3^+ terminale du substrat, ainsi que dans la liaison de l'ion calcium, la présence de cet ion dans l'APA ayant été démontrée par spectrophotométrie d'absorption atomique.

2) *Identification in vivo des voies métaboliques de l'AngII et de l'AngIII cérébrales*

In vitro l'AngII est transformée en AngIII sous l'action de l'APA, par hydrolyse de l'acide aspartique N-terminal. L'aminopeptidase N (APN, EC 3.4.11.2) quant à elle, produit l'angiotensine IV (AngIV) à partir de l'AngIII, par hydro-

lyse de l'arginine N-terminale. Afin de définir le rôle physiologique de ces deux enzymes dans le métabolisme des angiotensines cérébrales, il était indispensable de bloquer *in vivo*, leur activité par des inhibiteurs spécifiques.

Un programme de recherche sur la mise au point de tels inhibiteurs a été poursuivi dans le laboratoire de B. Roques (INSERM U266) par M.C. Founié-Zaluski, en collaboration avec notre équipe. Il a abouti à la synthèse d'inhibiteurs sélectifs de l'APA ou de l'APN : le 3-amino-4thio-butyl sulfonate (EC33) et le 2-amino-pentan-1,5dithiol (EC27).

Ces produits ont été étudiés *in vivo* en injectant par voie intracérébroventriculaire chez la souris de l'AngII tritiée en absence ou en présence de ces inhibiteurs. Après 8 min. les animaux ont été sacrifiés, l'hypothalamus prélevé et le contenu en AngII et en AngIII tritiées a été évalué par HPLC. Lorsque l'AngII est injectée en présence de l'inhibiteur d'APA, la demi-vie de ce peptide est augmentée d'un facteur 2, alors que la formation d'AngIII est complètement bloquée. A l'inverse, en présence de l'inhibiteur d'APN, le métabolisme de l'AngIII est très ralenti et sa demi-vie augmente de plus de 50 %.

Ces expériences démontrent que l'APA et l'APN sont respectivement impliquées dans le métabolisme de l'AngII et de l'AngIII dans le SNC.

B - Rôles respectifs de l'AngII et de l'AngIII dans le contrôle de la sécrétion de vasopressine (AVP)

De nombreuses études montrent que l'AngII ou l'AngIII injectées par voies i.c.v. sont capables d'augmenter la sécrétion d'AVP. Cependant, jusqu'à maintenant, il était difficile de préciser les rôles respectifs de ces deux peptides, l'AngII pouvant être transformée en AngIII *in vivo*.

La mise en évidence des voies métaboliques de ces deux peptides et la possibilité de bloquer sélectivement chacune de ces voies, nous a permis d'explorer le rôle de chacun des deux peptides. L'AngII ou l'AngIII (3 ng) ont été injectées chez la souris par voie i.c.v. en présence ou en absence des inhibiteurs (30 µg) puis les taux de vasopressine plasmatique ont été mesurés par dosage radioimmunologique 1 min après l'injection. L'inhibition de l'APA par l'EC33 supprime la sécrétion de vasopressine induite par l'AngII. A l'inverse, l'inhibition de l'APN par l'EC27 potentialise la sécrétion de vasopressine induite par l'AngIII.

Ces résultats suggèrent que, contrairement à l'AngII, l'AngIII serait l'un des principaux effecteurs du SRA dans le contrôle central de la sécrétion de vasopressine.

C - Récepteurs de l'AngII/AngIII de type 1 (AT1_A, AT1_B) et de type 2 (AT2)

La mise au point par l'industrie pharmaceutique de molécules bloquant le récepteur de l'angiotensine II nécessite que soit évalué en détail l'effet de l'an-

giotensine II sur d'autres cibles (cerveau et hypophyse) que celles déjà bien identifiées (vaisseaux et surrénales). Notre projet pourrait constituer une première approche d'une étude fine du mode d'action de l'angiotensine II au niveau central, via son récepteur. Cette étude permettrait non seulement de localiser le messenger de ces récepteurs (AT1_A, AT1_B, AT2) dans les différentes structures cérébrales mais aussi au niveau cellulaire afin d'associer à chaque sous-type de récepteur une fonction biologique. De plus, la mise en évidence de leur régulation nous permettra de mieux comprendre la modulation de ces fonctions au cours de différentes conditions physiopathologiques.

1 - Récepteurs AT1

a) Distribution dans le SNC et l'hypophyse

Parallèlement aux expériences de RT-PCR quantitative, la distribution des messagers des récepteurs AT1_A et AT1_B ainsi que leur régulation, seront explorées par des études d'hybridation *in situ*, utilisant des ribosondes spécifiques de ces deux sous-types de récepteur. Cette technique a été mise au point au laboratoire pour les tissus périphériques. Elle a été adaptée aux tissus cérébraux où l'expression de ces messagers est beaucoup plus faible qu'à la périphérie. Une étude préliminaire a montré la présence prédominante des messagers du récepteur AT1_A dans le SFO, l'OVLT, le noyau médian préoptique, le noyau paraventriculaire (PVN) ainsi que le cortex pyriforme, l'amygdale et le noyau du tractus solitaire et dans différents noyaux de la médulla, le récepteur AT1_B étant quant à lui exprimé majoritairement dans l'antéhypophyse. La seconde partie de l'étude a consisté à déterminer dans le PVN et le noyau supraoptique (SON), la distribution du messenger du récepteur et AT1_A ainsi que sa localisation cellulaire (neuronale ou gliale) et notamment sa présence dans les neurones magnocellulaires vasopressinergiques. A cet effet, un double marquage a été effectué sur des coupes de cerveau de rat par hybridation *in situ* à l'aide d'une ribosonde radioactive spécifique de la séquence du récepteur et AT1_A et d'une sonde oligonucléotide marquée à la dioxygénine, spécifique de la séquence de la VP, suivi d'une détection immunohistochimique d'un marqueur astrocytaire, la GFAP. Nos résultats indiquent que l'ARN messenger du récepteur et AT1_A est principalement exprimé par les neurones de la partie parvocellulaire dorsale et médiale du PVN. A l'inverse, aucun marquage n'a pu être détecté dans les neurones vasopressinergiques magnocellulaires, aussi bien dans le PVN que dans le SON. Cependant, dans le PVN, quelques neurones magnocellulaires non vasopressinergiques expriment ce récepteur.

La localisation neuronale des récepteur AT1_A dans la partie parvocellulaire du PVN semble parallèle à celle des neurones à CRF (adrénocorticolibérine) et pourrait rendre compte de l'effet stimulateur des angiotensines sur la libération de CRF. L'absence de récepteurs AT1_A sur les neurones vasopressinergiques

suggère une régulation indirecte de ces neurones via un autre neuromédiateur ou l'implication d'un type de récepteur de l'AngII encore inconnu.

b) *Etude de l'un des mécanismes de transduction des récepteurs AT1_A et AT1_B via une augmentation de Ca²⁺ induite par l'AngII*

Cette étude (effectuée en collaboration avec N. Bouby, INSERM U90) a tout d'abord été réalisée sur le rein connu pour exprimer une grande quantité de récepteurs AT1_A (85 %) et une quantité plus faible d'AT1_B (15 %). Elle sera poursuivie sur l'antéhypophyse qui exprime majoritairement le sous-type AT1_B.

Nous avons tout d'abord quantifié et localisé les messagers des récepteurs AT1_A et AT1_B le long des différents segments de néphron par RT-PCR, puis étudié la voie de transduction des récepteurs AT1_A et AT1_B via une augmentation de Ca²⁺ induite par l'angiotensine II dans les segments riches soit en AT1_A, soit en AT1_B. La mesure du Ca²⁺ est faite par microfluorimétrie avec la sonde fura-2. Les expériences de RT-PCR montrent que les messagers des récepteurs AT1_A et AT1_B sont exprimés en quantité égale dans le glomérule. Les autres segments de néphron tels que le tubule contourné proximal (PCT), la branche large ascendante corticale (CTAL) et médullaire (MTAL) et le canal collecteur médullaire (OMCD) expriment presque exclusivement les messagers du récepteur AT1_A. L'angiotensine II (10⁻⁷M) induit une augmentation de Ca²⁺ dans le glomérule ($\Delta = 110$ nM), le PCT ($\Delta = 50$ nM), le CTAL ($\Delta = 270$ nM), le MTAL ($\Delta = 290$ nM) et l'OMCD ($\Delta = 80$ nM). Ces augmentations de Ca²⁺ sont abolies par le Losartan (1 μ M). Des expériences de désensibilisation homologue montrent que dans le glomérule (AT1_A = AT1_B), une seconde application d'angiotensine II n'entraîne aucune augmentation de la concentration de Ca²⁺, alors que dans le CTAL et le MTAL (AT1_A), la seconde réponse à l'angiotensine II n'est pas totalement supprimée.

Ces résultats indiquent que dans le rein, la distribution des messagers des récepteurs AT1_A et AT1_B est tissu-spécifique et suggèrent également que ces deux sous-types de récepteurs sont probablement régulés différemment par l'angiotensine II.

2 - Récepteurs AT2

La séquence du récepteur AT2 ayant été publiée début décembre 1993, nous avons reclone cet ADNc à partir d'ARN de surrénales de rat afin d'en étudier la distribution de son ARNm par hybridation in situ. Après le travail effectué au laboratoire sur l'ontogénèse de l'AT2 chez le rat et sa distribution périphérique, une étude sur la topographie cérébrale du messager du récepteur AT2 est en cours de réalisation. Cette distribution est réalisée chez le rat, à l'aide de ribosondes correspondant à la totalité de la partie codante du gène du récepteur AT2. Le marquage est présent dans certains noyaux, différents de ceux contenant le récepteur AT1 (noyaux thalamiques, septum, noyau rouge, locus cœru-

leus, noyau de l'olive). Nous voulons ensuite identifier le type cellulaire (neurone ou astrocyte) exprimant ces récepteurs. Ceci nous permettra de définir sur quel neuromédiateur, les angiotensines agissent via ces récepteurs.

VII - RÉGULATION DE L'EXPRESSION ET DE LA TRANSCRIPTION DE L'ECA

Equipe : C. HUBERT, F. LEZOT

A - Régulations de l'expression de l'ECA par les hormone.

D'après les données de la littérature obtenues *in vivo* chez les rats et *in vitro* en culture de cellules endothéliales, l'ECA est régulée par les glucocorticoïdes et les hormones thyroïdiennes. Toutefois le niveau d'action de ces hormones n'est pas connu : Elles peuvent agir sur la transcription du gène, et ou sur la stabilité du transcrit. Il a été démontré dans de nombreux cas, et notamment pour l'hormone de croissance, que les glucocorticoïdes agissent sur la transcription mais aussi sur la stabilité de l'ARN messenger. Il en est de même pour les hormones thyroïdiennes où, dans le cas par exemple de l'enzyme malique, la triiodothyronine (T_3) stimule la transcription mais aussi stabilise le transcrit. Il est donc important de définir le ou les niveaux dans lesquels les hormones modulent l'expression de l'ECA.

Pour cela nous avons choisi deux lignées qui expriment l'ECA de type somatique. La première est endothéliale d'origine murine (b-end.4), lignée transformée par l'antigène moyen T de polyome. Celle-ci exprime deux fois plus d'activité enzymatique que les autres lignées endothéliales testées au laboratoire. La seconde provient d'un carcinome épithélial d'intestin humain (Caco-2). Nous avons trouvé que dans ces lignées l'activité enzymatique de l'ECA est bien stimulée par les glucocorticoïdes d'un facteur environ de 4. Par contre l'activité de l'enzyme n'est pas augmentée par la T_3 .

L'analyse par Northern blot de la quantité d'ARN codant l'ECA avec ou sans traitement hormonal montre qu'il y a une stimulation du transcrit par les glucocorticoïdes, mais que la T_3 n'a pas d'effet. Le trop faible signal d'ARNm provenant de cellules n'ayant pas subi de traitement hormonal ne permet pas d'estimer convenablement la stimulation due aux glucocorticoïdes a été mise au point, une méthode plus sensible pour quantifier l'ARN_m de l'ECA, consistant en une transcription reverse suivie d'une amplification de l'ADN_c ainsi obtenu par la polymérase thermostable (RT-PCR quantitative). La quantification de ces réactions est possible si l'on ajoute à l'ARN cellulaire (environ 300 ng) un ARN synthétique en trace (environ 30 fg) qui va subir les mêmes réactions permettant de suivre le rendement de chacune des étapes. L'ARN synthétique est très proche

de la séquence de l'ARNm cellulaire à amplifier, elle correspond à une délétion de 126 paires de bases dans le fragment amplifié. Cette méthode va nous permettre de déterminer le facteur de stimulation induit par les glucocorticoïdes.

La stabilité de l'ARN messenger de l'ECA va être étudiée en présence ou non d'hormone, en déterminant les demi-vies respectives du transcrit résiduel en présence d'une concentration de 5,6-dichloro 1- β ribofuranosylbenzimidazole inhibant spécifiquement l'ARN polymérase II. Ainsi nous pourrions déduire si les demi-vies respectives de l'ARNm de l'ECA, en présence ou en absence de glucocorticoïdes, peuvent rendre compte du facteur de stimulation hormonal ou si intervient une augmentation de la transcription de l'ECA.

La régulation de l'ECA au niveau transcriptionnel sera abordée dans des expériences de transcription *in vitro* de noyaux isolés, techniques dites de « run-on » où nous comparerons le taux d'élongation des transcrits en présence ou en absence de glucocorticoïdes. Ces différentes techniques permettront de déterminer à quels niveaux les glucocorticoïdes agissent sur l'expression de l'ECA.

B - Régulation de la transcription du gène de l'ECA

1 - Analyse fonctionnelle du promoteur somatique

Nous avons étudié l'activité transcriptionnelle du promoteur du gène de l'ECA, en transfection transitoire, dans plusieurs lignées cellulaires exprimant l'enzyme : cellules endothéliales transformées de lapin, cellules de tératocarcinome humain (Tera-1), et cellules d'un hépatocarcinome humain (HepG2) qui n'expriment pas l'ECA. La lignée de cellules endothéliales utilisée a été transformée par les antigènes T et t de SV40 sous la dépendance du promoteur de la vimentine, lignée établie dans le laboratoire de Denise Paulin à l'Institut Pasteur.

Cinq constructions ont été réalisées à partir des 1500 pb précédemment séquencées en 5' du gène de l'ECA, comprenant des fragments de taille différente. Ces fragments, ont été placés en amont d'un vecteur dépourvu de promoteur (vecteur pBLCAT3) dont l'expression de la chloramphénicol acétyl-transférase (CAT) est alors sous contrôle du promoteur inséré. Les différentes constructions transfectées dans les cellules stimulent l'activité CAT. Une cotransfection avec le vecteur d'expression de la β -galactosidase, contrôle de l'efficacité de transfection, nous a permis de comparer ces différentes constructions.

Dans les cellules endothéliales de lapin, l'activité optimale du promoteur est obtenue pour le fragment de 472 bp. Le promoteur de taille plus grande (de 754 à 1214 bp) n'augmente pas l'activité. Une atténuation de l'expression de CAT est observée pour le fragment de 343 bp. Enfin les premiers 132 bp du promoteur de l'ECA sont suffisants pour initier la transcription du gène.

Pour valider l'activité promotrice dans des cellules d'origine humaine, nous avons étudié les différents fragments du promoteur de l'ECA dans la lignée

Tera-1. Dans ce tératocarcinome l'activité promotrice est plus importante que dans un système inter-espèce. Les premiers 132 bp suffisent également pour stimuler l'initiation de la transcription et atteignent une activité transcriptionnelle maximale. Dans la lignée humaine (HepG2) qui n'exprime pas l'ECA, les cinq constructions du promoteur de l'enzyme ne stimulent que très modérément l'activité CAT comme il est communément observé dans les expériences faites *in vitro*.

L'ensemble de ces études a permis de mettre en évidence :

1) L'existence d'une activité promotrice de la région 5' du gène de l'ECA dans deux lignées cellulaires exprimant l'ECA (endothélium de lapin, tératocarcinome humain). Dans les cellules n'exprimant pas l'ECA (HepG2), l'activité promotrice reste très faible voire nulle. 2) L'activité promotrice est variable selon la taille du fragment du gène de l'ECA inséré. Ceci conduit à identifier au moins deux régions cis positives et deux négatives impliquées dans la régulation du gène. 3) Les 132 premières paires de bases du promoteur de l'ECA suffisent pour l'expression du gène dans une lignée cellulaire qui exprime l'enzyme (promoteur basal).

2 - Séquences nucléotidiques impliquées dans la régulation transcriptionnelle

Les 472 premières paires de bases du promoteur du gène de l'ECA confèrent une activité transcriptionnelle. Dans ce fragment nous avons identifié les séquences impliquées dans l'interaction avec des protéines nucléaires extraites de cellules exprimant l'ECA (Tera-1). Les expériences d'empreinte à la DNaseI indiquent quatre séquences reconnaissant, par analyse dans les banques de données, un certain nombre de facteurs de transcription comme, Sp1, AP-2, Ets-1. Il est maintenant souhaitable de comparer plusieurs extraits de protéines nucléaires provenant de cellules qui expriment ou qui n'expriment pas l'ECA afin de définir les facteurs impliqués dans l'expression du gène de l'ECA. Les expériences des complexes protéines-acides nucléiques retardés sur gel d'électrophorèse seront nécessaires pour préciser les bases impliquées dans la formation du complexe. Ceci sera confirmé par des études de compétition avec des oligonucléotides mutés sur certaines bases afin de déterminer la spécificité de l'interaction. La comparaison de séquences d'interaction avec d'autres gènes exprimés dans l'endothélium ou les épithéliums absorbants servira à identifier certains facteurs nécessaires à l'expression de l'enzyme dans un type cellulaire donné. Il faudra également vérifier, en transfection transitoire, si les séquences d'interaction avec les protéines nucléaires ont un rôle essentiel dans le contrôle de l'expression de l'ECA.

BIBLIOGRAPHIE

1994

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

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

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., MONNOT C., CORVOL P. and GASC J.-M. Distribution of type 1 angiotensin II receptor subtypes RNAs in the rat fetus. *Hypertension* 23 : 137-141, 1994.

SIBONY M., SEGRETAİN 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.

HUANG H., ARNAL J.-F., LLORENS-CORTES C., CHALLAH M., ALHENC-GELAS F., CORVOL P. and MICHEL J.-B. Discrepancy between plasma and lung angiotensin converting enzyme activity in experimental congestive heart failure : A novel aspect of endothelium dysfunction. *Circ. Res.* 75 : 454-461, 1994.

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.

CHAUVEL E., CORIC P., LLORENS-CORTES C., WILK S., ROQUES B.P. and FOURNIE-ZALUSKI M.-C. Investigation of the active site of aminopeptidase A using a series of new thiol-containing inhibitors. *J. Med. Chem.* 37 : 1339-1346, 1994.

CHAUVEL E., LLORENS-CORTES C., CORIC P., WILK S., ROQUES B.P. and FOURNIE-ZALUSKI-C. New β -aminothiols inhibitors of aminopeptidase A allowing differentiation with aminopeptidase N. *J. Med. Chem.* 94 : 2950-2957, 1994.

GASC J.-M., SHANMUGAM S., SIBONY M. AND CORVOL P. Tissue-specific expression of type 1 angiotensin II receptor subtypes. An in situ hybridization study. *Hypertension* 24 : 531-537, 1994.

LLORENS-CORTES C., GREENBERG G.B., HUANG H. and CORVOL P. Tissular expression and regulation of type 1 angiotensin II receptor subtypes by quantitative RT-PCR analysis. *Hypertension* 24 : 538-548, 1994.

BORENSTEIN P., GERMAIN S., FUCH S., PHILIPPE J., CORVOL P. and PINET F. Cis-regulatory elements and trans-acting factors directing basal and cAMP-stimulated human renin gene expression in chorionic cells. *Circ. Res.* 74 : 764-774, 1994.

VILLARD E., LALAU J.-D., VAN HOOFT I., DERKX F., HOUOT A.-M., PINET F., CORVOL P. and SOUBRIER F. A mutant renin gene in familial elevation of prorenin. *J. Biol. Chem.* 269 : 30307-30312, 1994.

KONOSHITA T., GASC J.-M., VILLARD E., SEIDAH N.G., CORVOL P. AND PINET F. Co-expression of PC2 and proenkephalin in human tumoral adrenal medullary tissues. *Biochimie* 76 : 241-245, 1994.

PINET F., GERMAIN S., BORENSZTEIN P., FUCHS S., PHILIPPE J. and CORVOL P. Molecular mechanisms in renin control. *Clin. Invest.* 72 : 688-690, 1994.

BONNARDEAUX A., DAVIES E., JEUNEMAITRE X., FERY I., CHARRU A., CLAUSER E., TIRET L., CAMBIEN F., CORVOL P. and SOUBRIER F. Angiotensin II type 1 receptor gene polymorphism in human essential hypertension. *Hypertension* 24 : 63-69, 1994.

WILLIAMS T.A., CORVOL P. and SOUBRIER F. Identification of two active site residues in human angiotensin I-converting enzyme. *J. Biol. Chem.* 269 : 29430-29434, 1994.

LECONTE I., CARPENTIER J.-L. and CLAUSER E. The functions of the human insulin receptor are affected in different ways by mutation of each of the four N-glycosylation sites of the β subunit. *J. Biol. Chem.* 269 : 18062-18071, 1994.

CONCHON S., MONNOT C., TEUTSCH B., CORVOL P. and CLAUSER E. Internalization of the rat AT1a and AT1b receptors: pharmacological and functional requirements. *FEBS Lett.* 349 : 365-370, 1994.

SOUBRIER F., WEI L., HUBERT C., CLAUSER E., ALHENC-GELAS F. and CORVOL P. Angiotensin I-converting enzyme: biochemical and structural properties of a duplicate enzyme. In « *Frontiers in Neurobiology* » A.J. Turner ed, Portland Press (London), pp. 199-217, 1994.

DE KEYZER, AUZAN C., LENNE F., BELDJORD C., THIBONNIER M., BERTAGNA X. and CLAUSER E. Cloning and characterization of the human V3 pituitary vasopressin receptor. *FEBS Lett.* 356, 215-220, 1994.

WILLIAMS T.A., CORVOL P., SOUBRIER F. and CLAUSER E. A recombinant form of angiotensin converting enzyme expressed from baculovirus-infected insect cells. *Biochimie* 76, 312-314, 1994.

SHANMUGAM S., CORVOL P. and GASC J.-M. Ontogeny of the two angiotensin II type 1 receptor subtypes in rats. *Am. J. Physiol.* 267 : E828-E836, 1994.

1995

BONNARDEAUX A., NADAUD S., CHARRU A., JEUNEMAITRE X., CORVOL P. and SOUBRIER F. Lack of evidence for linkage of the endothelial cell nitric oxide synthase gene to essential hypertension. *Circulation* 91 : 96-102, 1995.

ROUSSEAU A., MICHAUD A., CHAUVET M.-T., LENFANT M. and CORVOL P. The hemoregulatory peptide Acetyl-N-Ser-Asp-Lys-Pro is a natural and specific substrate of the N-terminal active site of human angiotensin-converting enzyme. *J. Biol. Chem.* 270 : 3656-3661, 1995.

CORVOL P., JEUNEMAITRE X., CHARRU A., KOTELEVTSYEV Y. and SOUBRIER F. Role of the renin-angiotensin system in blood pressure regulation and in human hypertension: New insights from molecular genetics. *In: Recent Progress in Hormone Research*, Academic Press Inc., vol. 50, pp. 287-308, 1995

CORVOL P., WILLIAMS T.A. and SOUBRIER F. Peptidyl dipeptidase A : Angiotensin I-converting enzyme. *In: Methods in Enzymology*, Academic Press Inc., Ed J. Burnett, Vol. 248, pp. 283-305, 1995.

SHANMUGAM S., LENKEI Z., GASC J.-M., CORVOL P. and LLORENS-CORTES C. Ontogeny of angiotensin type 2 (AT2) receptor mRNA in the rat. *Kidney Int.* 47 : 1095-1100, 1995.

SHANMUGAM S., LLORENS-CORTES C., CLAUSER E., CORVOL P. and GASC J.-M. Expression of angiotensin II AT2 receptor mRNA during development of rat kidney and adrenal gland. *Am. J. Physiol.* 268 : F922-F930, 1995.

LENKEI S., CORVOL P. and LLORENS-CORTES C. The angiotensin receptor subtype AT1A predominates in rat forebrain areas involved in blood pressure, body fluid homeostasis and neuroendocrine control. *Mol. Brain Res.* 30 : 53-60, 1995

DELLA BRUNA R., PINET F., CORVOL P. and KURTZ A. Opposite regulation of renin gene expression by cyclic AMP and calcium in isolated mouse juxtaglomerular cells. *Kidney Int.* 47 : 1266-1274, 1995.

LECONTE I. and CLAUSER E. Two sequences flanking the major autophosphorylation site of the insulin receptor are essential for tyrosine kinase activation. *Biochem. J.* 306, 465-472, 1995.

BERNSTEIN K.E., CLAUSER E. and BRINK M. Angiotensin II and the renin-angiotensin system. *In « Molecular biology of the kidney in health and disease »* D. Schlondorff & J.V. Bonventre, eds., 91-105, 1995.

PASCOE L. and CURNOW M.C. Genetic recombination as a cause of inherited disorders of aldosterone and cortisol biosynthesis and a contributor to genetic variation in blood pressure. *Steroids*. 60 : 22-27, 1995.

WILLIAMS T.A., VILLARD E., PRIGENT Y., DADOUNE J.-P. and SOUBRIER F. A genetic study of angiotensin I-converting enzyme levels in human semen. *Mol. Cell. Endocrinol.* 107 : 215-219, 1995.

NABIKA T., BONNARDEAUX A., JAMES M., JULIER C., JEUNEMAITRE X., CORVOL P., LATHROP M. and SOUBRIER F. Evaluation of the SA locus in human hypertension. *Hypertension* 25 : 6-13, 1995.

EXPOSÉS, CONGRÈS

Monsieur Eric Clauser a participé aux congrès et colloques suivants : Endocrine Society meeting. Anaheim Ca. June 1994 ; FASEB summer research conference on neural mechanisms in cardiovascular regulation. Vermont Academy. Saxtons River VE. USA ; Conference J. Monod on glycoconjugates : structure, metabolism and molecular biology. La Londe-les-Maures April 25-29, 1994 ; 19^e réunion des endocrinologues de langue française. Montréal 22-24 septembre 1994 ; Endocrine Society meeting. Washington DC. June 1995.

Madame Catherine Llorens-Cortes a donné des séminaires dans différentes unités INSERM et CNRS : INSERM U266 (B.P. Roques) - Paris ; INSERM U114 (J. Glowinski) - Paris ; CNRS URA1115 (D. Gourdj) - Paris. Elle a participé aux Congrès étrangers suivants : Colloque Franco-Allemand sur le thème "Communication paracrine" (orateur invité) - Berlin - 10-11 Octobre 1994 ; 3rd International Congress of Neuroendocrinology - Budapest, Hongrie - 3-8 Juillet 1994 ; 24th Annual Meeting of the Society for Neuroscience - Miami, USA - 13-18 Novembre 1994. Elle a participé au Club des Neurosciences (B. Calvino) (Société Française de Neurosciences) - Créteil ; XXII^e Colloque de la Société de neuroendocrinologie Française (Chairman et Orateur) - Sophia Antipolis - 1-3 Septembre 1994 ; II^e Forum de la Montagne-Sainte-Geneviève (Membre du Comité d'Organisation) - Paris - 21-22 Novembre 1994.

Mademoiselle Florence Pinet a participé aux congrès suivants : 25^e Congrès de la Société Allemande de Néphrologie (25-28 Septembre 1994) ; Colloque de la Société de Biologie Cellulaire de France (8-10 Mars 1995) ; 77th Annual Meeting of the Endocrine Society (14-17 Juin 1995) ; 13th International Congress of Nephrology (2-6 Juillet 1995).

Madame Catherine Monnot a participé aux congrès et séminaires suivants : 7th European Meeting on Hypertension - Milan (9-12 Juin 1995) ; Symposium de la Société de Pharmacologie Expérimentale - Paris (7 mars 1994) ; Invitée INSERM

U127 - Paris (3 Février 1995) ; Invitée - Laboratoire de Neurobiologie Cellulaire et Moléculaire du CNRS - Gif-sur-Yvette (10 mars 1995) ; Invitée - INSERM U367 - PARIS (31 Mars 1995).

Monsieur Pierre Corvol a participé aux congrès suivants : International Society of Hypertension - Melbourne (1994) ; International Congress on Steroid Hormones - Conférence plénière - Dallas (1994) ; Gordon Research Conference on angiotensin - Chairman - Pise (1994) ; European Congress of Pharmacology - Milan (1995) ; FASEB Meeting - Water and Electrolyte Homeostasis Distinguished Lectureship - Atlanta (1995) ; Il a donné une série de conférence à l'Université de Pennsylvanie - Philadelphie (1995).

ENSEIGNEMENTS

Monsieur Eric Clouser a participé aux enseignements suivants : DEA de Biochimie (P^r Morange) ; DEA d'endocrinologie moléculaire (P^r Milgrom) ; DEA Biologie de la cellule normale et pathologique (D^r Rosselin) ; DEA de pharmacologie (D^r Hanoune) ; C2 d'endocrinologie (D^r Vincens).

Madame Catherine Llorens-Cortes a participé à l'enseignement C2 et DU de Pharmacologie Endocrinienne - Université Paris VII ; au Jury du DEA de Neurosciences Paris VI-Paris IX.

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.

Madame Catherine Monnot a participé à l'enseignement lors du stage organisé par Rhône-Poulenc-Rorer sur l'Initiation à la pharmacologie moléculaire, mécanismes de reconnaissance moléculaire et messagers - Paris - 11 Janvier 1995 ; et à la Formation Permanente du Centre Scientifique d'Orsay (Université Paris-Sud XI) - Pharmacologie et toxicologie moléculaires - Orsay - 19 mai 1995.

LISTE DES DIPLÔMÉS

1994

Thèse

Catherine Monnot : Analyse des relations structure-fonctions et des interactions moléculaires et fonctionnelles des récepteurs de l'angiotensine II de type 1. 19 décembre 1994.