

## Médecine expérimentale

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

Le cours de la Chaire de Médecine Expérimentale a porté sur la transgénèse et la recombinaison homologue dans le système cardio-vasculaire. Le rôle des gènes peut être étudié *in vivo* par les techniques d'addition de gène (transgénèse additive), de suppression de gène (inactivation par recombinaison homologue). Il est aussi possible de quantifier le rôle des gènes dans un phénotype en multipliant le nombre de copies d'un gène donné (recombinaison homologue avec duplication génique — effet de dosage de gène). Ces techniques permettent d'étudier : 1 - L'implication spatio-temporelle des gènes dans l'ontogénèse du cœur et des vaisseaux ; 2 - Le rôle des gènes dans l'homéostasie cardio-vasculaire par des expériences de type gain de fonction ou suppression de fonction ; 3 - D'établir des modèles murins proches de la pathologie humaine tels que certaines maladies monogéniques responsables d'athérosclérose ; 4 - D'apprécier les interactions de différents gènes entre eux et d'évaluer l'effet de l'environnement dans un contexte génétique déterminé.

Les limites de la transgénèse additive sont l'absence de contrôle du site d'insertion dans le génome (le gène peut s'insérer dans un gène essentiel de l'organisme ou à proximité d'un gène qui modifiera le taux de transcription du transgène) et l'impossibilité de maîtriser le nombre de copies du transgène. La transgénèse peut être réalisée chez la souris, le rat et d'autres espèces animales. Le meilleur exemple est celui de l'hypertension artérielle induite chez le rat par transgénèse du gène Ren-2 de la souris. Une des limites actuelles de la recombinaison homologue est qu'elle se restreint à la souris, ce qui ne permet pas des études phénotypiques détaillées quoique des progrès récents dans l'instrumentation cardio-vasculaire chez cet animal ont permis d'obtenir des résultats importants. Les techniques d'inactivation conditionnelle de gènes (système cre-lox) se mettent actuellement en place et permettront prochainement d'inactiver à un moment donné un gène donné.

Plusieurs modèles ont été détaillés dans ce cours afin d'illustrer l'apport de ces techniques dans le système cardio-vasculaire. *Le premier exemple a été celui du peptide natriurétique auriculaire (ANP)*. Ce peptide est sécrété par les oreillettes, sous le contrôle d'un promoteur puissant auriculaire et ventriculaire. La perfusion d'ANP entraîne une natriurèse et une baisse de la pression artérielle chez l'animal et l'homme. La transgénèse additive a été réalisée par L. Field en utilisant un promoteur hépatique puissant. Une caractérisation physiologique détaillée de ces animaux a montré un taux d'ANP plasmatique augmenté de 10 fois chez la souris transgénique, l'absence d'anomalies hydroélectrolytiques plasmatique et urinaire, un abaissement de la pression artérielle moyenne basale de 25 mmHg. La perfusion de sérum physiologique entraîne une augmentation du volume urinaire et un accroissement de l'excrétion sodique chez les animaux transgéniques par rapport aux animaux sauvages. L'ensemble de ces résultats montre que la production élevée d'ANP chez les animaux transgéniques s'accompagne d'un effet physiologique soutenu, comparable à celui observé lors de l'administration aiguë de ce peptide. Ce résultat était inattendu dans la mesure où la perfusion d'ANP pendant plusieurs jours semblait entraîner une désensibilisation des récepteurs et une atténuation de l'effet physiologique.

*L'inactivation du gène de l'ANP* (S.W. John et coll.) a montré, inversement, que les animaux homozygotes avaient une pression artérielle systolique élevée de 10 mmHg par rapport aux animaux sauvages. De plus, les animaux homozygotes ANP  $-/-$  ont un abaissement de l'hématocrite, ce qui confirme le rôle de l'ANP dans l'augmentation de la perméabilité vasculaire. Enfin, les animaux homozygotes sont sensibles à l'administration de sel ; ils élèvent leur pression artérielle après deux semaines d'exposition au sel de façon plus marquée que les animaux sauvages. *L'inactivation du gène du récepteur GC-A de l'ANP*, l'un des deux récepteurs de l'ANP couplés à la guanylate cyclase membranaire, par MJ Lopez s'accompagne, là encore, d'une élévation de la pression artérielle. Il n'existe toutefois pas, dans ce cas, d'influence de l'apport sodé sur le niveau de la pression artérielle : le régime sodé élève de façon similaire la pression artérielle des animaux homozygotes GC-A  $-/-$  et sauvages. Ces résultats pourraient s'interpréter par l'existence d'autres récepteurs (récepteurs GC-B et de clairance) sur lesquels agit l'ANP. Il existe par ailleurs une réponse normale du système rénine-angiotensine-aldostérone. Dans l'ensemble, ces résultats, montrent, pour la première fois, que l'ANP exerce un effet vasodilatateur soutenu et contrôle le tonus basal de la pression artérielle chez la souris. Les résultats des expériences de transgénèse additive sur le rôle de l'ANP dans l'homéostasie cardio-vasculaire et hydroélectrolytique ont été confirmées par les expériences en miroir d'inactivation du gène de l'ANP ou du récepteur GC-A.

*Les endothélines* ont été initialement découvertes par la production par les cellules endothéliales d'un peptide puissamment vasoconstricteur, l'endothéline-1. Il existe trois isoformes, les endothélines 1, 2 et 3, et deux récepteurs, ETA et ETB. L'endothéline 1, synthétisée par les cellules endothéliales, agit sur ces

mêmes cellules *via* le récepteur ETB et provoque une vasodilatation médiée par la production de monoxyde d'azote. La même endothéline agit aussi sur les cellules musculaires lisses vasculaires et provoque une vasoconstriction médiée par le récepteur ETA. Les effets les mieux documentés des endothélines concernaient le domaine cardio-vasculaire jusqu'à l'inactivation récente du gène de l'ET1. Celle-ci, réalisée par Kurihara, a révélé que les animaux décédaient de détresse respiratoire à la naissance du fait de malformations du tractus respiratoire supérieur. Les animaux avaient des anomalies morphologiques des tissus et des organes crano-faciaux dérivés des arches pharyngées. Aucune de ces anomalies n'étaient présentes chez les animaux hétérozygotes ET1  $-/+$  ou sauvages. Les anomalies constatées concernent des organes développés à partir des cellules ectomésenchymateuses dérivées de la crête neurale. De fait, l'ET1 est exprimée précocement à ce niveau.

Les anomalies liées à l'inactivation du gène ET1 intéressent aussi le système cardio-vasculaire : les souris homozygotes, dont les mères sont en outre traitées par un antagoniste sélectif du récepteur ETA, ont fréquemment une interruption de l'arc aortique, une hypoplasie tubulaire de l'aorte, des artères sous-clavières aberrantes et un défaut de fermeture de la paroi interventriculaire. L'hybridation *in situ* confirme l'expression précoce de l'ET1 dans l'endothélium des arches artérielles et du coussin endocardique. L'ensemble de ces malformations crano-faciales associées à des interruptions de la crosse de l'aorte est à rapprocher des syndromes congénitaux de Pierre-Robin ou de DiGeorge observés chez l'homme.

La pression artérielle est modestement mais significativement élevée chez les hétérozygotes ET1  $-/+$ . Ce résultat était inattendu dans la mesure où l'ET1 a un effet presseur : l'administration d'ET1 élève nettement la pression artérielle chez l'animal. Il est possible que cette élévation de la pression artérielle chez les animaux ET1  $-/+$  soit liée à une baisse de la pression partielle en oxygène elle-même due aux anomalies du contrôle nerveux cardio-pulmonaire chez ces animaux. De fait, on avait montré antérieurement que l'administration intracisternale d'ET1 modifiait les décharges des neurones vasomoteurs et affectait le tonus sympathique. Ces résultats suggèrent donc que l'inactivation d'un des allèles du gène ET1 conduit à un effet presseur.

Des expériences d'inactivation de gènes menées sur *le récepteur ETB et l'endothéline 3* ont montré que ces gènes participent aussi à la différenciation de deux lignées cellulaires issues des cellules de la crête neurale, les neurones des ganglions du plexus mésentérique et les mélanocytes. L'inactivation du récepteur ETB ou de l'ET3 donne un phénotype similaire : un mégacolon distal par absence d'innervation intrinsèque et une hypopigmentation. Ce phénotype est à rapprocher de celui observé chez des mutants spontanés chez la souris (Piebald lethal et Lethal spotting) liés respectivement à une délétion et à une inactivation du récepteur ETB et de l'endothéline 3. Ces découvertes ont aussi révélé que certaines formes de la maladie de Hirschprung (mégacolon héréditaire) chez l'homme étaient liées à une inactivation du récepteur ETB ou de l'ET3.

*L'étude du métabolisme des lipides* a beaucoup progressé grâce aux techniques de transgénèse et de recombinaison homologue. Le métabolisme des lipides chez la souris diffère de celui observé chez l'homme à plusieurs égards : le taux de cholestérol total y est similaire mais les souris ont un taux très élevé d'HDL ; elles ne développent pas d'athérosclérose, même en présence d'un régime riche en graisse ; elles ont un taux bas de LDL cholestérol et n'ont pas de Lp(a). La recombinaison homologue et la transgénèse ont permis de créer des modèles expérimentaux d'athérosclérose proches des maladies génétiques observées chez l'homme.

*L'hypercholestérolémie familiale* est une maladie autosomale dominante chez l'homme qui se traduit par une hypercholestérolémie importante, une élévation du LDL cholestérol et une baisse du HDL cholestérol, un athérome précoce et sévère. La mort survient habituellement dans la 2<sup>ème</sup> ou 3<sup>ème</sup> décennie dans les formes homozygotes par suite d'affection coronarienne. Le récepteur des LDL est inopérant du fait d'une délétion ou de mutations inactivatrices. *Le gène du récepteur LDL a été inactivé chez la souris* par Ishibashi et coll. Chez les souris homozygotes, on observe un doublement du taux de cholestérol total au cours d'un régime normal en graisses, mais une élévation de cinq fois de ce taux lors d'un régime riche en cholestérol. Parallèlement, on observe chez les souris homozygotes une augmentation considérable des taux de VLDL, IDL/LDL. La clairance des protéines LDL est considérablement allongée chez ces souris. Lors d'un régime riche en graisse, elles développent une xanthomatose cutanée et sous-cutanée ainsi qu'un athérome sévère, proche de celui constaté dans la maladie humaine équivalente. Ce modèle ainsi que celui du lapin Watanabé, déficient en récepteur du LDL cholestérol, ont permis d'évaluer l'effet de la correction de l'absence de récepteur LDL par l'introduction du gène de ce récepteur dans des cellules hépatiques par l'intermédiaire de vecteurs rétroviraux ou adénoviraux.

Une approche *ex vivo* de thérapie génique de l'hypercholestérolémie familiale a été développée et étudiée chez cinq patients. Après hépatectomie partielle, les hépatocytes du patient sont mis en culture, transfectés par un rétrovirus comportant le récepteur humain du LDL et les hépatocytes recombinants perfusés dans la veine mésentérique inférieure afin de coloniser le foie. Une expression transitoire du récepteur LDL dans un nombre limité d'hépatocytes a été obtenue pendant plusieurs mois. Une diminution significative et prolongée du LDL cholestérol a été observée chez 3 des 5 patients. Un accroissement du catabolisme des LDL a aussi été observé. Ces résultats montrent la faisabilité de cette thérapie génique qui n'a pas entraîné d'effets secondaires. Toutefois, l'efficacité modeste des procédés actuels rend indispensable le développement de nouvelles méthodes permettant d'améliorer nettement le rendement du transfert de gènes.

*L'inactivation du gène de l'ApoE*, composant des VDL, IDL, HDL, chylomicrons et remnants des chylomicrons, provoque une athérosclérose plus marquée que l'inactivation du récepteur du LDL chez la souris. C'est à l'heure actuelle le

modèle le plus utilisé pour l'étude de l'athérosclérose génétique expérimentale chez le petit rongeur. Les équipes de Breslow et de Maeda ont réalisé indépendamment cette inactivation qui s'accompagne d'une élévation importante du taux de cholestérol total, des taux de LDL et IDL, et d'un abaissement du HDL. Les triglycérides sont normaux. Les souris homozygotes ApoE<sup>-/-</sup> soumises à un régime athérogène développent en quelques semaines un athérome intéressant le sinus coronaire, la racine de l'aorte, les valves aortiques et l'ensemble des gros vaisseaux, particulièrement leurs bifurcations. On observe chez la souris homozygote tous les stades de développement des lésions athéromateuses (adhésion des monocytes, cellules spumeuses, dépôts de cholestérol et plaques fibreuses), à l'instar de l'athérome humain. Les mêmes lésions sont observées chez la souris homozygote soumise à un régime normal, mais à un âge plus tardif. Ce modèle permet d'envisager l'étude des interactions de gènes sur le développement de l'athérosclérose. Ainsi, il est possible d'étudier l'effet d'un des gènes du système rénine sur l'expression de l'athérosclérose en croisant des souris dont le gène de l'ApoE a été inactivé avec des souris génétiquement modifiées et possédant une ou deux copies du gène de l'ACE.

*La transgénèse additive de l'ApoE* élève, comme attendu, le taux d'ApoE circulant, abaisse les lipoprotéines, sauf l'HDL, et induit une résistance à l'hypercholestérolémie provoquée par le régime. Mais les expériences les plus intéressantes concernent la correction du déficit de l'ApoE chez la souris par différentes techniques de transgénèse ciblée. Bellosta a montré qu'il était possible de corriger le métabolisme lipidique des souris ApoE<sup>-/-</sup> par l'expression du gène de l'ApoE humaine dans les macrophages. Après croisement avec les souris exprimant le gène de l'ApoE humaine dans les macrophages, les souris ApoE<sup>-/-</sup> ont un taux de cholestérol et de lipoprotéines plasmatiques similaire aux souris ApoE<sup>-/-</sup> sans transgène de l'ApoE humaine. Toutefois, l'expression du transgène ApoE humain dans les macrophages pulmonaires et péritonéaux s'accompagne d'une réduction des lésions d'athérosclérose lors d'un régime riche en cholestérol. Ces données démontrent que l'ApoE exprimée dans les macrophages est capable d'être anti-athérogène, même en présence de taux plasmatiques élevés de lipoprotéines athérogènes, du fait d'une action tissulaire. Cette ApoE locale accroît l'afflux de cholestérol à partir des cellules de la paroi artérielle.

Il est aussi possible de corriger l'absence de gène ApoE en modifiant génétiquement des cellules médullaires. Linton et coll. ont transplanté des cellules médullaires provenant de souris sauvages (ApoE<sup>+/+</sup>) chez des souris ApoE<sup>-/-</sup> chez qui a été pratiquée au préalable une irradiation léthale de leurs cellules médullaires. La transplantation des cellules médullaires sauvages chez les souris déficientes en ApoE<sup>-/-</sup> ramène le taux d'ApoE à 13 % de la normale. Le taux de cholestérol est abaissé de l'ordre de 50 à 70 % chez ces souris par rapport aux souris ApoE<sup>-/-</sup>. Le gène de l'ApoE est exprimé dans le poumon, le rein, l'intestin grêle de ces souris et les lésions d'athérosclérose aortique et coronaire sont très nettement réduites par la synthèse d'ApoE provenant des cellules déri-

vées de la moëlle sanguine. Les résultats montrent, ici encore, que l'ApoE exprimée dans des macrophages présents dans les tissus extra-hépatiques (rate, poumon, rein, intestin) sont capables d'épurer les lipoprotéines athérogènes.

Enfin, le gène humain de l'ApoA1 est capable de diminuer la susceptibilité à l'athérosclérose chez les souris ApoE  $-/-$ . Le croisement de souris transgéniques pour le gène de l'ApoA1 humaine avec les souris ApoE  $-/-$ , suivi d'un croisement en retour avec les souris ApoE  $-/-$ , montre que les souris déficitaires en ApoE, mais exprimant le gène de l'ApoA1, ont certes une élévation similaire du cholestérol total plasmatique à celle des souris ApoE  $-/-$ , mais une élévation du HDL cholestérol et une diminution de l'ordre de 6 fois de la susceptibilité à l'athérosclérose, telle qu'elle peut être évaluée par les index histométriques de quantification des lésions. Ces résultats montrent qu'il est possible de corriger la propension à développer une athérosclérose chez des souris ApoE  $-/-$  par transfert génique d'un autre gène, non directement impliqué dans le métabolisme de l'apoprotéine déficiente.

Les trois exemples de protection de l'athérosclérose par manipulation génétique rapportés ci-dessus illustrent bien aussi le rôle de l'apolipoprotéine E exprimée dans d'autres tissus que le foie. L'absence de correction des anomalies des lipoprotéines plasmatiques dans tous ces cas ne préjuge pas de l'effet protecteur que permet l'ApoE exprimée dans les macrophages de la paroi artérielle et de tissus extra-hépatiques.

P. C.

#### RAPPORT D'ACTIVITÉ DU LABORATOIRE

### *I — ÉTUDE ET CARACTÉRISATION DE L'EXPRESSION DE LA RÉNINE ET DE L'ENZYME DE CONVERSION DE L'ENDOTHÉLINE : DEUX GÈNES IMPLIQUÉS DANS LA PHYSIOLOGIE ET LA PATHOLOGIE CARDIO-VASCULAIRE*

Équipe : F. PINET, S. GERMAIN, S. FUCHS, J. PHILIPPE, J-M. LE MOULLEC,  
C. PARNOT, P. KORTH

Le travail de ce groupe s'articule principalement autour de deux thèmes de recherche concernant des gènes impliqués dans la physiologie et la pathologie cardio-vasculaire : l'étude et la caractérisation de l'expression de la rénine et de l'enzyme de conversion de l'endothéline.

#### *A. Régulation de la transcription du gène de la rénine humaine*

En utilisant des cellules humaines productrices de rénine (cellules chorio-niques), nous avons effectué une analyse fonctionnelle par transfection, une détermination de séquences sur lesquelles se lient des facteurs nucléaires (em-

preinte à la Dnase I) et une caractérisation des interactions ADN/protéines par gel retard. Étant donné l'importance de l'AMPc dans la régulation de la production de rénine, nous nous sommes particulièrement intéressés à déterminer les séquences intervenant dans la régulation par l'AMPc du gène de la rénine. Nous avons montré 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 donner une réponse complète à l'AMPc.

Le clonage récent au laboratoire de 15 kb du promoteur de la rénine humaine ainsi que du 1er intron ouvrent de nouvelles perspectives pour identifier les régions régulatrices du gène. *a) Analyse fonctionnelle du promoteur de la rénine.* Outre le modèle des cellules chorioniques, d'autres modèles de cellules productrices de rénine sont à notre disposition, les cellules As4.1 (obtenues par transgénèse et oncogénèse ciblée) et les cellules CALU6 dérivées d'un carcinome pulmonaire. *b) Cartographie de nouvelles régions régulatrices du gène de la rénine.* Les éléments *cis* régulant l'expression d'un gène sont représentés par des sites d'hypersensibilité à la DNase I. En utilisant les cellules chorioniques, un site sur le gène de la rénine a été découvert à -5kb du site d'initiation de la transcription et sera précisé ultérieurement grâce aux différents fragments de 15 kb du promoteur. La mise au point de cette technique nous permettra d'avoir la même approche avec les cellules CALU6. *c) Clonage du facteur de transcription se liant sur le motif Pit-1.* Nos résultats ont montré qu'il existait un ou des facteurs(s) tissu-spécifique(s) pour les cellules chorioniques autre que Pit-1 et qui se lie(nt) sur la séquence consensus de Pit-1, TAATAAATCAG. Deux stratégies sont envisagées : le clonage de ce facteur à partir d'une banque d'expression préparée à partir de cellules chorioniques ou le clonage à partir d'une banque de rein humain par la technique de simple hybride. *d) Caractérisation du promoteur de la rénine humaine par transgénèse.* Parallèlement à ces travaux qui utilisent des modèles de culture cellulaire, nous voulons caractériser *in vivo* les facteurs transcriptionnels responsables de la régulation du gène de la rénine lors de situations physiologiques (déplétion sodée, ontogénèse rénale). L'utilisation d'animaux transgéniques permettra d'étudier le gène de la rénine dans un contexte chromatinien.

### B. Étude structure/fonction de l'enzyme de conversion de l'endothéline

L'étude de la structure/fonction de l'enzyme de conversion de l'endothéline (ECE) humaine a pour but une meilleure connaissance de cette enzyme qui convertit la big endothéline, peptide quasi inactif, en un puissant vasoconstricteur, l'endothéline 1 (ET-1). *a) Mise au point d'outils et de modèles.* Nous avons cloné l'isoforme ECEa à partir des cellules endothéliales HUVEC et recloné l'isoforme b par RT/PCR. L'expression des deux isoformes a été effectuée en cellules CHO et celle de la forme soluble (ECEs) (dépourvue du domaine d'ancrage à la membrane) sera réalisée dans la levure *Pichia Pastoris*. Des

anticorps ont été obtenus contre des peptides différenciant l'isoforme ECEa de l'isoforme ECEb et contre des peptides situés sur la partie commune C-terminale de la molécule. Des anticorps contre la protéine native (ECEs) seront préparés pour la mise au point d'un dosage direct de l'ECE humaine. L'activité ECE est mesurée par luminescence dans une cellule recombinante. *b) Caractérisation des acides aminés importants pour l'activité de l'ECE.* L'ECE fait partie de la famille des gluzincines et contient le motif consensus **HEXXH**. Nous déterminerons les acides aminés impliqués dans le site actif, ceux impliqués dans la liaison au zinc et les sites de glycosylation importants. *c) Expression des deux isoformes de l'ECE.* L'expression (hybridation in situ, immunocytochimie) et la régulation différentielle (RT/PCR quantitative des deux isoformes) dans différents tissus et cellules vasculaires seront étudiées avec pour but l'implication physiopathologique de l'ECE.

## II — SYSTÈME RÉNINE-ANGIOTENSINE ET DÉVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE

Équipe : J.-M. GASC, M. SIBONY, H. KEMPF, S. SCHÜTZ, M. BRAND, M.-T. MORIN, F. MONGIAT.

En plus de leurs effets vasoconstricteurs sur l'animal, l'angiotensine II (AngII) et les endothélines peuvent exercer un rôle dans la croissance et la différenciation au cours du développement embryonnaire. Cette hypothèse est à l'origine des projets dont les résultats sont présentés dans ce rapport.

Suivant le même thème que les années précédentes sur l'ontogénèse du système rénine-angiotensine et en particulier des récepteurs de l'angiotensine II, le travail a été orienté vers les stades jeunes du développement chez le rat et chez l'homme, vers l'obtention d'outils moléculaires permettant d'étudier expérimentalement la fonction de ces hormones dans le développement de l'embryon de poulet, et s'est ouvert à l'étude du système endothéline dans l'embryon.

### A. Ontogénèse précoce du récepteur $AT_2$ de l'angiotensine II

Le récepteur de type 2, ou  $AT_2$ , a peu ou pas de rôle chez l'animal adulte. Son expression à un niveau très élevé pendant le développement fœtal avait conduit à le considérer comme un récepteur fœtal impliqué dans l'organogénèse. Nous avons montré son expression dès 11 jours de gestation (E11) dans l'embryon de rat, dans une chaîne de cellules alignées de part et d'autre de l'aorte. Nous avons maintenant montré que, à E11, les toutes premières cellules dans lesquelles l'ARNm du récepteur  $AT_2$  est détecté par hybridation in situ n'ont pas encore l'enzyme caractéristique des cellules ganglionnaires sympathiques différenciées, la tyrosine hydroxylase (TH). A E12, une colocalisation du récepteur  $AT_2$  et de la TH sur les mêmes coupes a permis de montrer que les cellules  $AT_2$  positives

sont des cellules de la chaîne des ganglions sympathiques. A E12 et E13, aux stades où les ganglions sympathiques se forment, on observe un gradient inverse d'intensité de l'expression des ARNm d'AT<sub>2</sub> et de la TH. Plus une cellule est TH positive et moins le signal d'hybridation pour l'ARNm d'AT<sub>2</sub> est fort, avec même des cellules qui expriment seulement AT<sub>2</sub> (les plus ventrales vers le tube digestif) ou seulement TH (les plus dorsales).

Bien que le rôle du récepteur AT<sub>2</sub> dans la vasomotricité reste controversé, ce récepteur est présent dans les couches les plus externes des gros troncs artériels du cœur jusque plusieurs jours après la naissance. Nous avons montré qu'il existe une exclusion réciproque entre l'expression de l' $\alpha$ -actine de muscle lisse dans les couches les plus internes de la tunica media, et l'expression du récepteur AT<sub>2</sub> dans les couches externes de la media et de l'adventice.

A partir de ces observations, qui font l'objet d'un article en préparation, et de l'ensemble de notre travail sur l'ontogénèse et la régulation spatio-temporelle du récepteur AT<sub>2</sub> nous avons proposé que ce récepteur serait soit un marqueur des cellules entreprenant la différenciation terminale et fonctionnelle, soit même un acteur de ces processus. Ce rôle éventuel de l'AngII via son récepteur AT<sub>2</sub> est en accord avec les résultats récents montrant l'antagonisme exercé par AT<sub>2</sub> sur la stimulation de la croissance cellulaire induite via le récepteur AT<sub>1</sub>, antagonisme pouvant aller jusqu'à l'induction de l'apoptose.

#### *B. Ontogénèse du système rénine-angiotensine dans l'embryon humain*

Aucun travail complet sur l'ontogénèse des composants du système rénine-angiotensine n'existait ni chez le rat, ni chez l'homme. L'utilité d'une telle étude systématique apparaît si l'on sait que tout traitement visant à bloquer le système rénine-angiotensine chez la femme enceinte peut avoir des conséquences graves et irrémédiables sur le fœtus, dès les premiers stades du développement embryonnaire. Il a été montré qu'un système rénine-angiotensine complet peut fonctionner très tôt dans le développement (dès 30-35 jours de gestation), avec en particulier l'expression des deux types de récepteurs. Ceci justifie la grande prudence dans l'utilisation d'agents bloquant ce système à n'importe quel niveau chez la mère et confirme l'hypothèse du rôle possible de l'AngII via son récepteur AT<sub>2</sub> sur le processus de croissance et différenciation dès les stades précoces du développement.

#### *C. Le récepteur de l'angiotensine II de Poulet*

L'expression du récepteur de l'AngII de poulet qui avait été cloné précédemment a présenté des difficultés inattendues. Alors que le récepteur AT<sub>1</sub> de rat s'exprime bien après transfection dans des cellules COS ou CHO, il est apparu que le récepteur de poulet inséré dans la même construction plasmidique s'exprimait à un niveau trop faible pour envisager une caractérisation de ses propriétés.

Nous avons donc entrepris de construire un récepteur chimère avec des séquences non traduites, en 5' et en 3', qui permettent l'expression du récepteur de dinde. L'hybridation *in situ* sur l'embryon de poulet dans les premiers jours de l'incubation a montré l'apparition de l'ARNm des récepteurs dès avant 4 jours et une distribution tissulaire qui ne correspond ni à celle d'AT<sub>1</sub> ni à celle d'AT<sub>2</sub> de mammifères. Un seul récepteur de l'AngII a été identifié chez les oiseaux et nous essayons de vérifier s'il est vraiment unique.

#### D. *Système rénine-angiotensine et reproduction*

L'inactivation du gène de l'ECA par recombinaison homologue a montré le rôle clé de cette enzyme pour la fertilité du mâle. Le travail en cours consiste à montrer que l'on peut exclure un rôle intratesticulaire de l'ECA puisque que la spermatogénèse et la spermiogénèse se déroulent normalement, y compris chez les animaux ECA  $-/-$  qui sont hypofertiles. Par ailleurs, nous étudions les animaux ECA  $+/-$  qui semblent transmettre avec la même fréquence l'allèle + et l'allèle —, alors que celui-ci est cause de stérilité à l'état homozygote. Nous étudions par immunoloration et hybridation *in situ* l'expression de l'ECA au cours de la spermiogénèse des souris ECA  $+/-$  pour mettre en évidence par quel mécanisme les spermatozoïdes *eca* — peuvent devenir phénotypiquement *eca+* et acquérir une capacité de fécondation égale aux spermatozoïdes *eca+*.

Dans l'ovaire, en plus de l'ECA, exprimée dans des cellules folliculaires dès avant la naissance, le récepteur AT<sub>2</sub> aussi est exprimé mais beaucoup plus tardivement. Son apparition, vers 21 jours chez le rat, coïncide avec le premier cycle de maturation des ovocytes. Cependant, AT<sub>2</sub>, tout comme l'ECA, serait exprimé seulement dans les follicules en voie d'atréxie. Ceci est à mettre en relation avec le rôle du récepteur AT<sub>2</sub> dans l'induction de l'apoptose déjà démontré sur des cellules folliculaires en culture. La relation entre cet effet de l'angiotensine II et l'effet toujours contesté, mais à nouveau récemment rapporté chez la lapine, sur l'ovulation reste à éclaircir.

#### E. *Ontogénèse du système endothéline*

Les endothélines sont des peptides vasoconstricteurs, qui agissent par des récepteurs de la même super-famille que ceux de l'AngII. Tout comme l'AngII, les endothélines 1 et 3 ont, en plus de leurs effets sur la tension artérielle, des effets d'une autre nature au cours du développement embryonnaire. Ces effets sont montrés par certaines mutations naturelles ou expérimentales des endothélines et de leurs récepteurs et par des expériences en culture qui confirment la capacité des endothélines à jouer un rôle de facteur de croissance.

Nous avons entrepris une étude complète de l'ontogénèse des composants du système endothéline (endothélines 1 et 3, récepteurs A et B, et enzyme de

conversion de l'endothéline) dans l'embryon humain à partir du stade 10-11 (21-24 jours de gestation).

Les résultats les plus intéressants ont été obtenus sur les récepteurs ETA et ETB qui sont exprimés dans les crêtes neurales dès leur formation le long du tube neural au stade 10-11 (soit 10,5 jours de gestation chez le rat). Aux stades suivants du développement les cellules positives pour ETA et ETB migreront vers différentes structures, toutes connues pour être des sites de colonisation des cellules de crêtes neurales. La chronologie et la cartographie exacte des cellules exprimant les endothélines et leurs récepteurs ainsi que l'enzyme de conversion sont en cours d'élaboration.

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

Équipe : M.T. CHAUVET, C. HUBERT, A. MICHAUD, T. WILLIAMS, M. GOUTTAYA

Les projets de recherche correspondent à deux aspects de l'enzyme de conversion de l'angiotensine I ou ECA.

1) 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 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 :

- a) la spécificité de chacun des sites actifs vis à vis de substrats naturels ou synthétiques et des inhibiteurs spécifiques de chacun de ces sites.
- b) à cristalliser l'enzyme ; L'ECA est une protéine dont la structure tridimensionnelle est en effet encore inconnue. Une étude est engagée en vue de la cristallisation de l'ECA de drosophile et la détermination de sa structure tertiaire.

2) L'ECA est une protéine membranaire de type I, c.a.d 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 extracellulaire mais qui possède toutes les propriétés enzymatiques de la forme ancrée. L'étude du mécanisme de libération par protéolyse de la forme circulante présente un intérêt général, des protéines telles que la protéine précurseur du peptide amyloïde, le TGF  $\alpha$  ou le TNF  $\alpha$  subissent des protéolyses de même type.

#### A. Différences enzymatiques des deux sites actifs de l'ECA

##### *Spécificité vis à vis de nouveaux substrats*

L'utilisation des trois enzymes recombinantes produites par les cellules CHO transfectées par le cDNA de l'ECA membranaire soit normal soit portant des

mutations sur les deux histidines du site actif N-terminal ou du site actif C-terminal permet de déterminer les spécificités de chaque site actif.

La dégradation du peptide hémorégulateur NAcSer-Asp-Lys-Pro (AcSDKP) qui exerce une régulation négative sur la prolifération des cellules hématopoïétiques est due à l'action initiale de l'ECA par libération du dipeptide KP. 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. L'ECA serait ainsi impliquée, par l'intermédiaire de son domaine N-terminal, *in vitro* et *in vivo* dans la régulation de l'hématopoïèse.

De la même façon nous souhaitons identifier un substrat spécifiquement hydrolysé par le site actif C-terminal qui pourrait correspondre au substrat naturel de l'ECA testiculaire. Nous nous proposons de développer une technique originale d'affinité pour la recherche de substrats à partir d'extraits de cellules germinales de rat à différents stades de la maturation des spermatides qui nous seront fournis par l'équipe du Docteur B. Jégou (INSERM U435-Rennes).

Parmi les substrats synthétiques utilisés pour doser l'activité enzymatique de l'ECA, le plus courant est Hip-His-Leu (méthode de dosage Cushman). Cet hippuryl dipeptide correspond au dipeptide C-terminal de l'angiotensine I et présente une spécificité vis à vis du site C-terminal de l'ECA. Nous recherchons l'hippuryl dipeptide correspondant pour le site N-terminal. Nous avons testé le peptide Hip-Lys-Pro mimant le carboxydipeptide de AcSDKP et Hip-Ala-Pro ayant la même séquence dipeptidique que le captopril. Ces deux substrats synthétiques, très affins vis à vis de l'ECA, sont hydrolysés par les deux sites actifs de façon comparable à celle de l'angiotensine I. D'autres synthèses sont en cours.

#### *Sensibilité des deux sites actifs vis à vis des inhibiteurs*

Étant donné le rôle du domaine N-terminal dans la dégradation du peptide AcSDKP il est important de trouver des inhibiteurs spécifiques de ce domaine de l'ECA. En effet, leur administration, lors de chimiothérapie, permettrait d'augmenter *in vivo* la stabilité de ce peptide et de maintenir en phase quiescente les cellules souches hématopoïétiques durant le traitement cytotoxique. Nous effectuons une étude préliminaire où les trois enzymes recombinantes servent à tester trois inhibiteurs de l'ECA (captopril, lisinopril, fosinopril) sur 5 substrats : 2 naturels (AI et AcSDKP) et 3 substrats synthétiques (Hip-His-Leu, Hip-Ala-Pro, Hip-Lys-Pro) afin de déterminer leur spécificité vis à vis des deux sites actifs et leur efficacité vis à vis de différents substrats. Cette étude montre que l'efficacité d'un inhibiteur est fonction du substrat choisi pour tester son pouvoir inhibiteur ; d'autre part, l'inhibition de chaque site actif ne reflète pas toujours celle de l'enzyme possédant les deux sites actifs. Si l'inhibition testée sur Hip-His-Leu est comparable à celle testée sur l'angiotensine I, aucun substrat synthétique ne peut être utilisé à la place du substrat naturel AcSDKP. Nous avons un projet de

recherche d'inhibiteurs sélectifs pour chaque site actif par chimie combinatoire de peptides phosphiniques, en collaboration avec V. Dive (département d'ingénierie et de l'étude des protéines du CEA, Saclay).

### B. Structure tridimensionnelle de l'ECA

L'ECA est une protéine dont la structure tridimensionnelle est encore inconnue du fait de sa complexité due à son haut poids moléculaire apparent (170 kDa) et la forte homologie de séquence des deux domaines actifs extracellulaires. En collaboration avec un groupe de cristallographes (Pr Simon Phillips, Université de Leeds, UK), Tracy Williams a entrepris cette étude sur une enzyme de 74 kDa ne possédant naturellement qu'un seul site actif : l'ECA de drosophile qui a été récemment clonée. Une construction a été réalisée afin de produire cette protéine en grande quantité (280 mg/litre) dans un système de levure (*Pichia pastoris*). La protéine active, ainsi obtenue, est, après purification, actuellement en cours de cristallisation. Des cristaux préliminaires ont été obtenus mais pour faciliter cette étape, l'hétérogénéité de l'ECA, due à des états différents de glycosylation, a été supprimée par élimination des trois chaînes de N-glycosylation par mutagénèse dirigée des résidus d'asparagine 53, 196, et 311. Une protéine homogène a été obtenue sans altération majeure de stabilité et conservation des propriétés enzymatiques. La finalité de ce projet est la détermination de la structure tertiaire de l'ECA de drosophile puis, par modélisation moléculaire, l'extrapolation des résultats aux domaines N et C de l'ECA humaine.

### C. Solubilisation de l'ECA endothéliale

La solubilisation de la forme membranaire correspondant à l'ECA endothéliale humaine a été étudiée dans une lignée de CHO transfectée soit par le cDNA correspondant à l'ECA endothéliale soit par le cDNA correspondant au domaine C-terminal de l'ECA. Nous avons pu démontrer que le processus protéolytique intervenait au niveau de la membrane plasmique et que la protéine correspondant au domaine C-terminal de l'ECA est libérée 10 fois plus vite dans le milieu en une heure, ce qui indique un rôle inhibiteur du domaine N-terminal dans ce mécanisme de protéolyse. La forme plasmique a une extrémité C-terminale AGQR identique à celle de la forme sécrétée dans la cellule CHO transfectée, laissant supposer un mécanisme protéolytique de même type au niveau de la cellule endothéliale humaine. De la même façon le domaine C-terminal de l'ECA endothéliale exprimé dans la levure *Pichia pastoris* est relargué dans le milieu de culture et nous vérifierons si une sécrétion peut être observée lorsque ce domaine est exprimé dans la levure *Saccharomyces cerevisiae*, notre but étant de cloner et de séquencer la protéase impliquée.

IV — *ÉTUDE DU TRAFIC INTRACELLULAIRE DES MOLÉCULES  
DES SYSTÈMES RENINE-ANGIOTENSINE ET ENDOTHÉLINE*

Équipe : C. TOUGARD, E. VILA-PORCILE, L. MULLER (départ en Avril 1996),  
A. BARRET, R. PICART

Ce groupe est rattaché à la Chaire de Médecine Expérimentale depuis le 1er Janvier 1996.

L'objectif général des recherches de cette équipe, depuis plusieurs années, était d'analyser les différentes étapes du processus sécrétoire dans les cellules neuroendocrines et en particulier dans la cellule antéhypophysaire à prolactine. Dans un premier temps, les résultats obtenus par ce groupe s'inscrivent dans la continuité de ces recherches. Dans un deuxième temps, à dater du 1er Janvier 1996, le thème de recherche de ce groupe a été réorienté vers l'étude du trafic intracellulaire lié au processus sécrétoire et à l'endocytose de molécules des systèmes rénine-angiotensine et endothéline, molécules impliquées dans la régulation de l'hypertension artérielle. Ces recherches sont menées sur des modèles de cellules endothéliales et de cellules antéhypophysaires.

A. *Étude du processus sécrétoire dans la cellule à prolactine*

1 — *Identification du site de clivage protéolytique de la sécrétogranine II*

La sécrétogranine II est une protéine spécifique de la matrice des grains de sécrétion des cellules neuroendocrines et des neurones, qui contient de nombreux sites de clivage dibasiques et qui est considérée comme un précurseur potentiel de peptides biologiquement actifs. En effet, des peptides, issus de clivages protéolytiques séquentiels de la sécrétogranine II, sont libérés dans le milieu de culture des cellules à prolactine de rat (Muller et Tougard, 1995). Des expériences cinétiques de « pulse chase », réalisées sur des cellules dont le transport intracellulaire était perturbé par un abaissement de la température et/ou par un traitement par la bréfeldine A, ont permis de préciser le site d'initiation de cette maturation protéolytique au niveau d'un sous-compartiment tardif du réseau trans-golgien, avant l'étape de formation des grains de sécrétion. Ces résultats ont fait l'objet d'un manuscrit soumis pour publication (Muller et al).

2 — *Recherche d'enzymes spécifiques susceptibles d'intervenir dans la maturation protéolytique des produits de sécrétion des cellules à prolactine*

Cet axe de recherche a été abordé récemment dans le groupe, en collaboration avec le laboratoire du Professeur P. Cohen (Paris). Nous avons ainsi précédemment mis en évidence, dans les compartiments mis en jeu dans le processus sécrétoire de la prolactine, la présence d'une métallo-endopeptidase, la NRD convertase, et d'une aminopeptidase de type B. Ces enzymes ont également été

détectées au niveau des mêmes compartiments subcellulaires dans les cellules de la lignée de phéochromocytome de rat PC 12.

Ces recherches ont été poursuivies cette année par une étude de la distribution subcellulaire de deux prohormones convertases (PC), PC1 (encore appelée PC3) et PC2, qui sont exprimées dans l'hypophyse du rat et qui sont susceptibles d'être impliquées dans la maturation protéolytique de la sécrétogranine II. Cette étude a été réalisée, par différentes approches d'immunocytochimie ultrastructurale, à l'aide d'anticorps dirigés contre les peptides N- et C- terminaux des formes matures de ces deux protéases (en collaboration avec N. Seidah, Montréal et I. Lindberg, La Nouvelle-Orléans). Les deux proconvertases ont été détectées, à des degrés variables, dans tous les compartiments membranaires mis en jeu dans le processus sécrétoire dans les cellules à prolactine : outre les grains de sécrétion, PC1 est principalement détectée dans les saccules lisses de l'appareil de Golgi, alors que PC2 est principalement observée dans les citernes du reticulum endoplasmique rugueux. Cette différence dans la distribution subcellulaire de ces deux enzymes dans les cellules à prolactine suggère un transport intracellulaire distinct lié à la spécificité de leur fonction (manuscrit en préparation).

3 — *Le rôle fonctionnel joué par certaines protéines G hétérotrimériques intracellulaires dans le trafic membranaire* entre l'appareil de Golgi et la membrane plasmique a été recherché dans les cellules à prolactine de rat de la lignée GH3B6 (en collaboration avec V. Homburger et J. Bockaert, Montpellier).

Nous avons en effet précédemment montré (Muller et al, 1994) la présence de certaines sous-unités  $\alpha$  de protéines G hétérotrimériques, non seulement au niveau de la membrane plasmique des cellules à prolactine, mais également au niveau de la membrane des grains de sécrétion. Cette étude a été abordée avec différentes stratégies : nous avons étudié, d'une part, l'effet d'agents interférant sur le cycle d'échange GDP-GTP sur des cellules intactes et sur des cellules perméabilisées par la streptolysine O et, d'autre part, nous avons surexprimé les sous-unités  $\alpha$  de certaines protéines G hétérotrimériques.

L'ensemble des résultats obtenus met en évidence un rôle des protéines G dans la régulation de la sécrétion de prolactine et de sécrétogranine II. En outre, la surexpression de  $G_{\beta 3} \alpha$  augmente les capacités de stockage de ces protéines dans les grains de sécrétion. Cependant, nous n'avons pas obtenu d'arguments en faveur d'une participation directe d'une protéine G hétérotrimérique particulière à une étape spécifique du transport intracellulaire entre l'appareil de Golgi et la membrane plasmique.

B. *Étude de la distribution subcellulaire de molécules des systèmes rénine-angiotensine et endothéline*

1 — *Le système rénine-angiotensine dans les cellules de l'antéhypophyse du rat*

On sait, depuis quelques années, que les composants du système rénine-angiotensine sont présents dans l'hypophyse. La plupart des protéines nécessaires à la biosynthèse d'angiotensine II, ainsi que les ARN messagers de plusieurs de ces protéines, ont été détectées au niveau de cellules glandulaires de l'antéhypophyse. Ceci suggère donc l'existence d'un système local complet dans l'hypophyse. Cependant, les données sur la localisation cellulaire des différents composants du système ne sont pas toujours convergentes en fonction des espèces considérées. Et la question qui reste posée concerne la possibilité d'un système rénine-angiotensine complet au niveau d'un type cellulaire donné de l'antéhypophyse. Pour répondre à cette question, il est indispensable d'identifier non seulement les types cellulaires concernés, mais surtout les compartiments intracellulaires où ces molécules sont susceptibles d'interagir. Cette question est d'autant plus importante qu'il est connu que l'angiotensine II exerce une fonction régulatrice sur la sécrétion de prolactine et d'ACTH. Nous avons donc abordé l'étude de la distribution subcellulaire des différents composants du système dans l'antéhypophyse du rat par différentes approches immunocytochimiques ultrastructurales.

a) *Rénine et angiotensinogène*

Le travail entrepris actuellement tend à préciser les localisations cellulaires, subcellulaires et éventuellement extracellulaires de ces composants. L'étude sera plus particulièrement axée sur la détermination des sites subcellulaires de maturation de la pro-rénine et de l'angiotensinogène. Les premiers résultats obtenus en microscopie électronique par double marquage à l'or colloïdal indiquent la présence de pro-rénine et d'angiotensinogène dans les grains de sécrétion des cellules à prolactine ; l'angiotensinogène serait également présent dans certains autres types cellulaires.

Cette étude sera poursuivie par une exploration de la distribution de ces protéines chez les rats mâles et femelles dans diverses conditions physiologiques (âges différents, gestation, allaitement). Parallèlement, pour essayer de déterminer les interactions pouvant exister entre les composants du système rénine-angiotensine à l'intérieur d'une même cellule, E. Vila-Porcile tentera d'appliquer, sur des cellules antéhypophysaires dispersées, la technique du « reverse hemolytic plaque assay » qui permet de mesurer la sécrétion d'une protéine à l'échelle d'une cellule.

b) *Enzyme de conversion de l'angiotensine*

Des observations préliminaires obtenues par immunocytochimie électronique nous ont permis de mettre en évidence la présence d'enzyme de conversion de

l'angiotensine (ECA) sur la membrane plasmique de cellules non glandulaires de l'antéhypophyse, mais également sur la membrane plasmique de cellules à prolactine. Le même type de marquage est observé au niveau des cellules à prolactine de la lignée continue GH3B6.

## 2 — *Le système endothéline dans des lignées de cellules endothéliales humaines*

L'endothéline 1 (ET-1), qui est libérée par les cellules endothéliales, est synthétisée sous la forme d'une molécule précurseur qui subit plusieurs étapes de maturation. La dernière étape de cette maturation, le clivage d'une molécule intermédiaire, la big endothéline 1 (big ET-1) en ET-1, est catalysée par l'enzyme de conversion de l'endothéline (ECE), qui est une métalloprotéase membranaire. Les informations disponibles actuellement concernant le site éventuel de cette dernière étape de maturation sont extrêmement peu nombreuses.

Nous avons abordé cette étude très récemment sur un modèle de cellule endothéliale humaine en lignée continue avec des approches conjointes d'immunocytochimie et d'immuno-réplique avec, d'une part, des anticorps spécifiques dirigés contre différents peptides de l'ECE (en collaboration avec Roussel UCLAF) et, d'autre part, avec des anticorps spécifiques respectivement de la big ET-1 et de l'ET-1 (en collaboration avec le Professeur J. Fiet).

Ces expériences sont en cours et nous avons d'ores et déjà recueilli des informations issues des techniques d'immunofluorescence qui suggèrent des localisations intracellulaires de ces protéines. Nous poursuivons ces recherches à l'échelle ultrastructurale pour tenter d'identifier avec précision le site de maturation de la big ET-1 en ET-1 et de déterminer ainsi le site d'action de l'ECE.

## V — *ÉTUDE DE L'ORGANISATION ET DU RÔLE FONCTIONNEL DU SYSTÈME RÉNINE-ANGIOTENSINE CÉRÉBRAL : MÉTABOLISME ET RÉCEPTEURS*

Équipe : C. LLORENS-CORTES, S. ZINI, Z. LENKEI, G. VAZEUX, X. ITURRIOZ, A. HUS-CITHAREL, N. DE MOTTA

Le thème de ce groupe de travail est l'étude du rôle des peptides angiotensinergiques dans le contrôle central de la pression artérielle et la sécrétion des hormones hypophysaires. L'accent est mis 1) sur les enzymes impliqués dans le métabolisme de l'angiotensine II (AngII) et de l'angiotensine III (AngIII) ; 2) sur les récepteurs angiotensinergiques dans le système nerveux central et l'hypophyse. L'aminopeptidase A qui convertit l'AngII en AngIII est étudiée en détail.

A. *Ectœzymes et métabolisme de l'AngII et de l'AngIII cérébrales.*

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

a) *Étude 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 *in vitro* 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. 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  $K_m$  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. Ceci nous a conduit à proposer un modèle du mécanisme catalytique de l'aminopeptidase A basé sur celui établi pour la thermolysine. Dans ce modèle, l'ion  $Zn^{++}$  est coordonné aux azotes intracycliques de deux histidines (His385 et His389) et au carboxyle d'un reste Glu de la protéine (Glu408). Le quatrième ligand du zinc est une molécule d'eau. Lors de la catalyse enzymatique, un groupe  $COO^-$  d'un

acide glutamique (Glu386) polarise la molécule d'eau favorisant l'attaque nucléophile de celle-ci sur le carbonyle de la liaison peptidique à cliver. L'état de transition tétraédrique ainsi formé est stabilisé par le zinc et un ou plusieurs acides aminés qui restent à identifier, puis simultanément la liaison peptidique est scindée et un proton est transféré sur l'amine libre du peptide clivé. Là aussi le résidu donneur de proton reste à identifier.

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. L'aminopeptidase N (APN, EC 3.4.11.2) quant à elle, produit l'angiotensine IV (AngIV) à partir de l'AngIII, par hydrolyse de l'arginine N-terminale. Afin de définir le rôle physiologique de ces deux enzymes dans le métabolisme des angiotensines cérébrales, il est nécessaire de bloquer *in vivo*, leur activité par des inhibiteurs spécifiques.

Un programme de recherche sur la mise au point de tels inhibiteurs est développédans le laboratoire de B. Roques (INSERM U266) par M.C. Fournié-Zaluski, en collaboration avec notre équipe. Deux inhibiteurs sélectifs de l'APA et de l'APN ont ainsi été synthétisés : le 3-amino-4-thio-butyl sulfonate (EC33) sélectif de l'APA et le 2-amino-pentan-1,5-dithiol (EC27) sélectif de l'APN.

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 2.5, 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 voie 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 de définir leur implication respective dans la sécrétion d'AVP. L'AngII ou l'AngIII (0.5-5 ng) ont été injectées chez la souris par voie i.c.v. en présence ou en absence

des inhibiteurs 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 injecté par voie i.c.v., supprime de façon dose-dépendante la sécrétion d'AVP induite par l'AngII. Ces résultats indiquent que l'AngII doit être convertie en AngIII ou un autre métabolite pour induire une sécrétion d'AVP. A l'inverse l'inhibition de l'APN par l'EC27, injecté seul, produit une augmentation dose-dépendante de la sécrétion d'AVP. Celle-ci est bloquée par la co-administration d'un antagoniste des récepteurs angiotensinergiques : la saralazine.

Ces résultats indiquent que l'APN intervient dans le métabolisme de l'AngIII endogène. L'EC27 en protégeant l'AngIII de la dégradation lui permet de stimuler les récepteurs angiotensinergiques et par conséquent d'augmenter la sécrétion d'AVP.

En conclusion, l'AngIII apparaît comme l'un des principaux effecteurs du SRA dans le contrôle central de la sécrétion d'AVP.

### *C. Distribution de l'aminopeptidase A et effets de l'angiotensine III le long du néphron de rat*

Nous avons récemment étudié le long du néphron de rat la localisation des messagers des deux sous-types de récepteurs de l'angiotensine, AT<sub>1a</sub> et AT<sub>1b</sub> par RT-PCR. Les messagers du récepteur AT<sub>1a</sub> sont exprimés majoritairement le long du néphron, seul le glomérule (glom) exprime à la fois les messagers des récepteurs AT<sub>1a</sub> et AT<sub>1b</sub>.

Bien que l'AngII soit considérée à la périphérie comme étant le peptide biologiquement actif du système rénine-angiotensine, certaines études suggèrent que l'AngIII est aussi efficace que l'AngII, tout spécialement dans le cerveau et les glandes surrénales. En outre, l'APA responsable de la conversion de l'AngII en AngIII est largement distribuée dans le rein.

Pour ces raisons, nous avons examiné le long des différents segments micro-disséqués de rat, les effets de l'AngIII en étudiant 1) la distribution de l'APA, à l'aide d'un inhibiteur sélectif de cette enzyme (EC33) ; 2) les augmentations de calcium intracellulaire induites par l'AngIII, par microfluorimétrie avec la sonde Fura-2 ; 3) la caractérisation pharmacologique du récepteur impliqué dans la réponse à l'AngIII dans la branche large ascendante corticale (CTAL).

Les résultats montrent que :

1) L'activité APA est beaucoup plus importante dans le cortex que dans la médullaire. Les résultats exprimés en nmoles de  $\beta$ -naphthylamine/heure/glom ou/millimètre de longueur tubulaire sont les suivants : glom ( $1,89 \pm 0,18$ ), tubule contourné proximal : PCT ( $2,33 \pm 0,33$ ), pars recta corticale : CPST ( $4,38 \pm 0,45$ ) et médullaire : OSPT ( $1,62 \pm 0,38$ ), branche large ascendante

médullaire : MTAL ( $0,027 \pm 0,005$ ) et corticale : CTAL ( $0,11 \pm 0,05$ ), canal collecteur cortical : CCD ( $0,16 \pm 0,05$ ) et médullaire : OMCD ( $0,034 \pm 0,003$ ).

2) Les augmentations de calcium induites par 100 nM d'AngIII sont les plus élevées dans le PCT ( $244 \pm 29$  nM), le MTAL ( $162 \pm 25$  nM), le CTAL ( $210 \pm 26$  nM) et de moindre amplitude dans le glom ( $52 \pm 8$  nM) et l'OMCD ( $52 \pm 4$  nM). Ces réponses sont similaires à celles obtenues avec une dose équimolaire d'AngII.

3) Dans le CTAL, segment dans lequel le sous-type  $AT_{1a}$  est majoritairement exprimé : a) les valeurs d' $EC_{50}$  pour l'AngIII ( $13,5 \pm 0,5$  nM) et pour l'AngII ( $10,3 \pm 0,2$  nM) sont du même ordre, b) les augmentations de calcium induites par l'AngIII sont totalement abolies par le Losartan (un antagoniste des récepteurs AT1), inchangées par le PD123319 (un antagoniste des récepteurs AT2), c) on observe une désensibilisation croisée des réponses calciques induites par l'AngII et l'AngIII et enfin d) les effets de l'AngII et de l'AngIII ne sont pas additifs.

Ces résultats indiquent clairement que dans le CTAL, c'est le même sous-type de récepteur ( $AT_{1a}$ ) qui est impliqué dans la réponse à l'AngII et à l'AngIII.

En conclusion, il est intéressant de souligner que l'APA, comme l'ECA est distribuée selon un gradient de concentration qui augmente depuis le glom jusqu'à la CPST. Toutefois, les récepteurs AT1 ainsi que les réponses calciques (AngII, AngIII) sont présentes tout le long du néphron. L'ensemble de ces données suggère que l'APA joue probablement un rôle clé en générant l'AngII en AngIII tout particulièrement dans le cortex rénal.

#### D. Récepteurs de l'AngII/AngIII de type I ( $AT_{1a}$ , $AT_{1b}$ ).

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'angiotensine 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 messager de ces récepteurs ( $AT_{1a}$ ,  $AT_{1b}$ ) 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.

##### a) Distribution dans le SNC et l'hypophyse

Une cartographie complète des messagers des récepteurs  $AT_{1a}$  et  $AT_{1b}$  dans le cerveau de rat a été réalisée par hybridation *in situ* en utilisant des ribosondes spécifiques de ces deux sous-types de récepteur. Une expression prédominante

du récepteur  $AT_{1a}$  est présente dans le cerveau alors que le récepteur  $AT_{1b}$  est exprimé majoritairement dans l'antéhypophyse.

Le messager du récepteur  $AT_{1a}$  est présent dans les noyaux impliqués dans le contrôle de la pression artérielle comme l'organe subfornical, l'organe vasculaire de la lame terminale, les noyaux périventriculaire et paraventriculaire de l'hypothalamus, le noyau du tractus solitaire, le noyau parabrachial, le noyau moteur dorsal du vague, le noyau hypoglossus, le noyau ambigu et l'area postrema.

Il est aussi présent dans les structures préoptiques comme le noyau médian préoptique impliqués dans le contrôle de la prise de boisson. Dans certaines de ces structures, comme le noyau paraventriculaire ou le noyau médian préoptique les angiotensines modulent, en outre, la sécrétion de vasopressine et d'hormones hypophysaires comme la prolactine ou l'ACTH, dans certains cas de façon indirecte en agissant sur la dopamine et le CRF.

*b) Identification du type cellulaire exprimant les récepteurs  $AT_{1a}$  ou  $AT_{1b}$*

- Dans le SNC

La seconde partie de l'étude a consisté à déterminer dans le PVN et le noyau supraoptique (SON), la localisation cellulaire (neuronale ou gliale) du messager du récepteur  $AT_{1a}$  et notamment sa présence dans les neurones magnocellulaires vasopressinergiques. A cet effet, un triple 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  $AT_{1a}$  et d'une sonde oligonucléotidique marquée à la dioxygénine, spécifique de la séquence de la vasopressine, suivi d'une détection immunohistochimique d'un marqueur astrocytaire, la GFAP. Nos résultats indiquent que l'ARN messager du récepteur  $AT_{1a}$  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  $AT_{1a}$  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  $AT_{1a}$  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.

- Dans l'antéhypophyse

Afin d'identifier dans quel type cellulaire de l'adenohypophyse (somatotrope, corticotrope, lactotrope, thyrotrope, gonadotrope) sont exprimés les récepteurs  $AT_{1b}$ , nous avons utilisé deux approches différentes :

— Un fractionnement des cellules hypophysaires sur gradient de BSA, suivi d'une quantification de l'expression des messagers des récepteurs AT<sub>1b</sub> et AT<sub>1a</sub> par RT-PCR dans les différentes fractions.

— Un double marquage du tissu hypophysaire en utilisant une ribosonde radioactive dirigée contre le messager du récepteur AT<sub>1b</sub> et un anticorps dirigé contre la prolactine ou l'ACTH.

Nous avons constaté après fractionnement que 85 % des récepteurs AT<sub>1</sub> présents dans l'antéhypophyse étaient de sous-type AT<sub>1b</sub> et qu'ils étaient localisés préférentiellement dans les fractions enrichies en cellules lactotropes et corticotropes.

Par le double marquage, nous avons précisé l'expression prédominante des récepteur AT<sub>1b</sub> dans les cellules lactotropes et pratiquement indétectable dans les cellules corticotropes.

En conclusion, l'expression différentielle de ces deux sous-types de récepteurs AT<sub>1a</sub> dans le SNC et AT<sub>1b</sub> dans l'hypophyse, pourrait rendre compte des actions opposées de l'angiotensine II sur la sécrétion de prolactine aux niveaux hypothalamique et hypophysaire.

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

Équipe : E. CLAUSER, C. AUZAN, S. CONCHON, K. CURNOW, C. MONNOT,  
B. TEUTSCH et B. VIANELLO.

L'activité du groupe au cours de l'année 1995-96 a porté sur l'analyse du fonctionnement moléculaire des récepteurs de l'angiotensine II (AngII), de la vasopressine et de l'insuline. Ces études ont utilisé des techniques de biologie moléculaire (clonage, mutagenèse dirigée, PCR), 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). De plus 2 travaux plus cliniques ont recherché des anomalies géniques dans certaines tumeurs de la surrenale.

##### A. Les récepteurs de l'angiotensine II

Les récepteurs de l'AngII (AT<sub>1</sub> humain, AT<sub>1A</sub>, et AT<sub>1B</sub> de rat, AT<sub>2</sub> de rat) sont des récepteurs heptatransmembranaires couplés à des protéines G, qui ont été clonés. 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 différences ou spécificités pharmacologiques ou de leurs voies de signalisation.

- L'étude comparée du fonctionnement des récepteurs  $AT_{1A}$ ,  $AT_{1B}$  et  $AT_2$  de rat a fait l'objet de plusieurs travaux :

— La pharmacologie et la signalisation intracellulaire (production d'inositol phosphates et mobilisation du calcium intracellulaire, activation de l'adenylate cyclase et de la PLA2) des récepteurs  $AT_{1A}$ , et  $AT_{1B}$  ne présentent pas de différences significatives et ces deux récepteurs sont capables de transmettre les effets de l'AngII sur la synthèse protéique et la glycogénolyse. Cependant seul le récepteur  $AT_{1A}$ , est capable de transmettre l'effet mitogène de l'AngII en activant de façon prolongée les MAP kinases. De plus, l'analyse parallèle du récepteur  $AT_2$  exprimé dans les cellules CHO montre une pharmacologie classique pour ce récepteur, mais aucune activation des voies de signalisation classiquement activées par les protéines G et l'absence d'action de ce récepteur sur les synthèses protéique et l'ADN (B. Teutsch et al., en préparation).

— Le mécanisme de cet effet mitogène de l'AngII a été approfondi sur les cellules CHO. $AT_{1A}$ . 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. Enfin, nous n'avons pas pu mettre en évidence dans cette lignée d'activation des phosphorylations sur tyrosines des protéines totales ou de certaines protéines spécifiques (Jak2, STAT1, SHC, FAK et p60<sup>src</sup>), ce qui laisse supposer que les voies de signalisation des récepteurs tyrosine-kinases activées par l'AngII dans certains tissus comme le foie ou les cellules musculaires lisses ne participeraient pas à l'action mitogène de l'AngII dans CHO (E. Clauser et al, en préparation).

- Les déterminants moléculaires responsables de l'internalisation et de la désensibilisation du récepteur  $AT_{1A}$  ont été plus spécifiquement étudiés par délétions progressives de la séquence carboxyterminale 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 médiane 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. Les mécanismes potentiels de cette désensibilisation ont été analysés et semblent faire intervenir des voies homologues et hétérologues (S. Conchon et al. en préparation).

- Enfin les déterminants moléculaires responsables de l'absence de couplage aux protéines G du récepteur  $AT_2$  et les mutations susceptibles d'activer de façon constitutive et de déterminer la spécificité du couplage du récepteur  $AT_{1A}$  aux protéines G ont été recherchés par mutagenèse ou production de récepteurs chimériques modifiant la troisième boucle intracellulaire du récepteur  $AT_{1A}$ . Nous avons ainsi montré que c'est le segment distal de la 3<sup>ème</sup> boucle du récepteur  $AT_2$  et non le segment médian comme on le pensait qui est impliqué dans

l'absence de couplage de ce récepteur aux protéines G classiques. De plus des modifications dans le segment distal de la 3<sup>ème</sup> boucle intracellulaire du récepteur AT<sub>1A</sub> sont incapables de provoquer l'activation constitutive du récepteur mais entraînent des modifications partielles de spécificité de couplage aux protéines G. Tout ceci indique que le segment distal de la 3<sup>ème</sup> boucle intracellulaire du récepteur AT<sub>1A</sub> est important pour le couplage aux protéines G

### 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 le groupe de X. Bertagna (Endocrinologie, Hôpital Cochin) l'ADNc du récepteur humain V1b ou V3, dont nous avons caractérisé la pharmacologie, la signalisation et la distribution tissulaire.

Nous avons ensuite développé un travail utilisant l'outil de RT-PCR pour étudier l'expression de ce récepteur de la vasopressine, mais aussi celles de la POMC et du récepteur CRH dans l'hypophyse normale mais aussi des tumeurs hypophysaires sécrétant de l'ACTH, de la GH ou de la prolactine et des tumeurs non hypophysaires sécrétant ou non de l'ACTH (tumeurs carcinoïdes bronchiques, phéochromocytomes, métastases etc.). Nous avons ainsi pu montrer pour la première fois 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 par l'étude du rôle du domaine transmembranaire du récepteur dans la transmission du signal. La construction de plusieurs ADNc codant des protéines chimères dont le domaine transmembranaire a été remplacé par les domaines équivalents de plusieurs protéines ou récepteurs membranaires (récepteur EGF, oncoprotéine neu, glycophorine etc.) a été réalisée. La caractérisation fonctionnelle de ces récepteurs mutants est en cours en collaboration avec le groupe de G. CREMEL et P. HUBERT (INSERM U338, Strasbourg). De plus nous avons étudié les conséquences de l'inversion de la séquence du domaine transmembranaire du récepteur de l'insuline dans la biosynthèse, le fonctionnement et la signalisation des formes courte (hIRA) et longue (hIRB) du récepteur. Ce travail en cours de rédaction montre l'absence de conséquence fonctionnelle de cette inversion pour les deux formes du récepteur (C. Auzan et al. en préparation).

### D. Marqueurs des tumeurs de la surrénale

Des altérations de la séquence codante du gène AT<sub>1</sub> ont été recherchées dans 21 adénomes de Conn par PCR, SSCP et séquençage. L'hypothèse selon laquelle

l'adénome de Conn pourrait être du à une mutation constitutive du récepteur AT<sub>1</sub>, 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 hypersecrétants et le récepteur TSH. Malheureusement aucune mutation n'a été trouvée dans la séquence du récepteur AT<sub>1</sub> (E. Davies et al., soumis).

Enfin, un travail en cours recherche actuellement des mutations de l'oncogène *c-kit* dans les phéochromocytomes sporadiques. Cette tyrosine kinase membranaire proche de *ret* est fortement exprimée dans les phéochromocytomes et pourrait donc, comme *ret* pour la pathologie familiale, présenter une séquence altérée dans les phéochromocytomes sporadiques. La mutation classique du codon Asp816Val n'a pas été retrouvée dans 37 phéochromocytomes et d'autres mutations sont actuellement recherchées par SSCP et analyse par la cleavase.

## VII — GÉNÉTIQUE MOLÉCULAIRE DE L'HYPERTENSION ARTÉRIELLE HUMAINE

Équipe : X. JEUNEMAITRE, A-M. HOUOT, A. PERSU, A-P. GIMENEZ-ROQUEPLO,  
J. CÉLÉRIER, L. PASCÈ, P. MULATERO, P-F. PLOUIN.

### A. Génétique moléculaire de l'angiotensinogène

Le but de ce projet est l'étude approfondie biochimique des variants moléculaires du gène de l'angiotensinogène identifiés chez l'homme et leur association avec différentes formes d'hypertension artérielle.

Une recherche approfondie de polymorphismes de la région promotrice a été entreprise afin de détecter un variant fonctionnel, en déséquilibre avec le polymorphisme M235T lui-même associé une élévation de l'ordre de 20 % de la concentration plasmatique de la protéine. L'association des différents polymorphismes sous forme d'haplotypes a permis de confirmer l'association entre M235T et l'hypertension artérielle et l'importance possible d'une substitution nucléotidique en position — 6 du site initial de la transcription. Son implication fonctionnelle fait l'objet d'une collaboration avec le laboratoire de génétique humaine de JM Lalouel (Utah, USA).

Des résultats fonctionnels intéressants ont pu être mis en évidence *in vivo* chez une famille portant la mutation C248 de l'angiotensinogène. Cette mutation est associée à une baisse de l'ordre de 40 % du taux d'angiotensinogène plasmatique chez les porteurs hétérozygotes et, *in vitro*, à une glycosylation et une sécrétion anormales de la protéine dont la structure est modifiée, entraînant une modification de sa reconnaissance épitopique. La modification éventuelle de ponts disulfure dans la protéine mutée est en cours d'étude.

La mutation L10P a été retrouvée à l'état hétérozygote chez 2 parmi 187 familles françaises hypertendues. Cette mutation est d'un grand intérêt, car elle se situe sur le site de clivage de l'Ang I par la rénine. *In vitro*, il existe une meilleure affinité de l'AGT muté pour la rénine (Km abaissé de 10 fois) mais également une constante catalytique abaissée de 5 fois, avec pour conséquence une efficacité catalytique (Kcat/Km) de AGT-F10 plus de deux fois supérieure à celle observée pour l'AGT sauvage. De façon intéressante, l'efficacité catalytique observée *in vitro* pour l'Ang I-F10 vis à vis de l'ECA, étudiée *in vitro* à partir de peptides synthétiques purifiés, est de l'ordre de 3 fois supérieure à celle observée pour l'Ang I sauvage. *In vivo*, l'analyse quantitative des deux formes d'Ang I en fonction de l'affinité des deux angiotensines testées permet d'estimer que la quantité d'Ang I-F10 présente dans le plasma de ce sujet hétérozygote est environ 4 à 6 fois supérieure à celle de l'Ang I-L10 sauvage.

L'ensemble de cette recherche s'inscrit dans le cadre d'un programme général plus large de recherche sur l'angiotensinogène : mise au point d'un dosage ELISA (en collaboration avec SANOFI-Recherche), distinction des formes circulantes de haut et bas poids moléculaire de l'angiotensinogène, structure tertiaire et cristallisation de la protéine (en collaboration avec les laboratoires HOFFMANN-LAROCHE).

#### B. Implications du canal Na épithélial amiloride-sensible dans l'HTA essentielle

La présence de mutations drastiques des sous-unités  $\beta$  et  $\gamma$  de ce canal (protéines tronquées) dans la maladie de Liddle, qui associe une HTA précoce et sévère à transmission autosomale dominante et un profil biologique très particulier (perte potassique, rénine et aldostérone basses), soulève l'hypothèse de l'existence possible de mutations moins sévères de ce canal dans l'HTA essentielle, en particulier en cas de rénine basse. La recherche systématique de mutations de ce canal montrent des mutations ponctuelles des sous-unité  $\beta$  et  $\gamma$ , rares dans la population hypertendue caucasienne mais plus fréquentes parmi les sujets d'origine africaine. Nous entretenons une collaboration étroite avec le groupe du Dr P Barbry (laboratoire du Pr Lazdunski, Sophia Antipolis) pour la mesure fonctionnelle de cette mutation par expression en œufs de xénopes et patch-clamp. Les premiers résultats suggèrent une élévation significative du courant Na<sup>+</sup> sensible à l'amiloride pour chacune des mutations étudiées qui nécessitera d'être confirmée. Un projet est en cours visant à évaluer de façon précise l'implication des différentes sous-unités du canal Na<sup>+</sup> épithélial dans l'HTA essentielle.

#### C. Formes monogéniques d'hypertension artérielle

L'étude détaillée de quelques familles avec hypertension artérielle sévère et précoce ont permis de détecter une famille avec syndrome de Liddle authentique

et délétion de la partie C-terminale de la sous-unité  $\beta$  du canal Na épithélial, ainsi que l'étude approfondie d'une première famille française avec HTA suppressible par la dexaméthasone avec recombinaison inégale des gènes CYP11B1 et CYP11B2. Cette pathologie fait l'objet d'une recherche clinique (fréquence parmi les HTA précoces tout venant) et moléculaire (analyse des crossing-over, expression surrénalienne). Une cartographie physique de la région comprise entre les deux gènes CYP11B1 et CYP11B2 est en cours pour tenter d'identifier un gène impliqué dans la tumorigénèse surrénalienne observée dans cette maladie. Le gène de la  $11\beta$  HSD2 est en cours d'analyse chez deux familles avec syndrome d'excès apparent de minéralocorticoïdes.

#### D. *Gènes candidats : étude du système kalicréine-kinine*

Le système kalicréine-kinine est constitué d'une cascade enzymatique aboutissant à la génération de peptides vasodilatateurs et natriurétiques, antagonistes du système rénine-angiotensine. Une relation négative existe entre la pression artérielle et le niveau d'excrétion urinaire de kalicréine dont environ 50 % de la variance est génétiquement déterminé. Une étude de génétique moléculaire sur l'ensemble des composants de ce système est en cours. L'étude d'un marqueur microsatellite du kininogène (substrat du système) ne montre pas de liaison génétique avec l'hypertension artérielle essentielle tout venant. La recherche de mutations au niveau du gène de la kalicréine rénale indique la présence de plusieurs polymorphismes dont l'impact sur le niveau de kalicréine urinaire est en cours d'étude.

#### E. *Autres gènes et HTA*

Une collaboration étroite est entretenue avec le groupe du Pr Soubrier (Inserm U258) pour l'analyse de gènes candidats et un premier essai de clonage positionnel dans l'HTA essentielle familiale, en collaboration avec le groupe du Pr M Lathrop à Oxford (Wellcome Trust).

#### F. *Détermination des acides aminés responsables des différentes activités des isoenzymes synthétisant les gluco et les minéralocorticoïdes CYP11B1 et CYP11B2.*

Chez l'homme les étapes terminales de la biosynthèse des hormones stéroïdes, le cortisol et l'aldostérone, sont catalysées par des enzymes cytochromes P450 homologues CYP11B1 ( $11\beta$ -hydroxylase) et CYP11B2 (aldostérone synthase). Les gènes codant ces isoenzymes sont situés à environ 40-50 Kb de distance sur le même chromosome. L'hypertension artérielle sensible aux glucocorticoïdes est liée à l'existence d'un gène hybride CYP11B1-CYP11B2 ayant le promoteur du gène CYP11B1 mais la partie codante et l'activité catalytique de l'enzyme

CYP11B2. Ces deux enzymes catalysent la 11 $\beta$ -hydroxylation des précurseurs 11-déoxystéroïdes mais CYP11B2 catalyse ultérieurement la 18-hydroxylation et la 18-oxydation de la 11-déoxycorticostérone (DOC) pour produire l'aldostérone. Le diagnostic d'hypertension sensible aux glucocorticoïdes a été porté au laboratoire chez plusieurs familles françaises. L'une d'entre elle chez qui existait une tumeur surrénalienne ou une hyperplasie bilatérale des surrénales co-segrégant avec l'hypertension a été particulièrement étudiée. L'étude de la tumeur surrénalienne de l'un des patients affectés et du tissu surrénalien avoisinant ont permis de montrer l'expression du gène hybride CYP11B par RT-PCR et analyse de Northern blot. En culture cellulaire, l'expression du gène hybride était stimulée par l'ACTH. Il en résultait une augmentation de la production d'aldostérone et des stéroïdes hybrides (18 hydroxy — et 18-oxocortisol) caractéristique de l'affection.

Une étude récente a été menée pour tenter d'identifier les acides aminés responsables des activités glucocorticoïdes et minéralocorticoïdes des deux isoenzymes, CYP11B1 et CYP11B2. Il existe 35 acides aminés différents parmi les 503 acides aminés de ces protéines. Une étude systématique d'enzymes hydrides recombinants, exprimés en cellules COS, a montré que 12 acides aminés seulement seraient responsables de l'activité de 18-hydroxylation et de 18-oxydation de CYP11B2. Le remplacement de la sérine 288 de la CYP11B1 par la glycine augmente l'activité 18-hydroxylase tandis que le remplacement additionnel de la valine 320 par une aniline introduit une activité 18-oxydasique nécessaire pour la synthèse d'aldostérone. Ces acides aminés sont codés par les exons 5 et 6 des gènes CYP11B. Étant donné que cette simple modification peut transformer une enzyme de synthèse des glucocorticoïdes en une enzyme synthétisant l'aldostérone, il est possible que de minimes conversions géniques, impliquant les exons 5 et 6 des gènes CYP11B, puissent être responsables de nouvelles formes d'hyperaldostéronemes sensibles à la dexaméthasone et puissent ainsi contribuer à l'hypertension artérielle dite essentielle.

#### BIBLIOGRAPHIE

1995

CORVOL P., PINET F., PLOUIN P-F., BRUNEVAL P., GASC J-M., MENARD J. and MIMRAN A. Primary reninism. In : Hypertension : Pathophysiology, Diagnosis and Management, Laragh JH and BM Brenner (Eds), 2nd Édition, Vol. 1 and 2, pp 2069-2079, 1995.

CORMAN B., BARRAULT M-B., KLINGER C., HOUOT A-M., MICHEL J-B., DELLA BRUNA R., PINET F. and SOUBRIER F. Renin gene expression in the aging kidney : Effect of sodium restriction. Mech. Ageing Dev. 84 : 1-13, 1995.

SHANMUGAM S., LENKEI Z.G., GASC J.-M., CORVOL P.L. and LLORENS-CORTES C.M. Ontogeny of angiotensin II type 2 (AT<sub>2</sub>) receptor mRNA in the rat Kidney Int. 47, 1095-1100, 1995.

SIBONY M., COMMO F., CALLARD P. and GASC J.-M. Enhancement of mRNA *in situ* hybridization signal by microwave heating. Laboratory Investigation. 73, 586-591, 1995.

PASCOE L., JEUNEMAITRE X., LEBRETHON M.-C., CURNOW K.M., GOMEZ-SANCHEZ C.E., GASC J.-M., SAEZ J.M. and CORVOL P. Glucocorticoid-suppressible hyperaldosteronism and adrenal tumors occurring in a single french pedigree. J. Clin. Invest. 96, 2236-2246, 1995.

BONNARDEAUX A., NADAUD S., CHARRU A., JEUNEMAITRE X., CORVOL P. and SOUBRIER F. Exclusion of the endothelial nitric oxide synthase as a candidate gene for essential hypertension. Circulation 91 : 96-102, 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.

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

SHANMUGAN S., LLORENS-CORTES C., CLAUSER E., CORVOL P. and GASC J.-M. (with the technical assistance of M.-T. MORIN and F. MONGIAT) Expression of angiotensin II AT<sub>2</sub> 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 AT<sub>1A</sub> 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.

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.

INOUE I., ROHRWASSER A., HELIN C., JEUNEMAITRE X., VRAIN P., BOHLENDER J., LIFTON R.P., CORVOL P., WARD K. and LALOUEL J.M. A mutation of angiotensinogen in a patient with preeclampsia leads to altered kinetics of the renin-angiotensin system. J. Biol. Chem. 270 : 114330-11436, 1995.

CORNELL M.J., WILLIAMS T.A., LAMANGO N.S., COATES D., CORVOL P., SOUBRIER F., HOHEISEL J., LEHRACH H. and ISAAC R.E. Cloning and expression of an

evolutionary conserved single-domain angiotensin converting enzyme from *Drosophila melanogaster*. J. Biol. Chem. 270 : 13613-13619, 1995.

HAAB F., DUCLOS J.M., GUYENE T.T., PLOUIN P.F. and CORVOL P. Renin secreting tumors : Diagnosis, conservative surgical approach and long-term results. J. Urol. 153 :1781-1784, 1995.

CORVOL P., WILLIAMS T.A. and SOUBRIER F. Peptidyl dipeptidase A (angiotensin-converting enzyme). In : Methods in Enzymology, " Proteolytic Enzymes : Aspartic and MetalloPeptidases ), 248 : 283-305, 1995.

SABERAN-DJONEIDI D., MAREY-SEMPER I., PICART R., STUDLER J.M., TOUGARD C., GLOWINSKI J. and LEVI-STRAUSS M. A 19-KDa protein belonging to a new family is expressed in the Golgi apparatus of neural cells. J. Biol. Chem., 270 : 1888-1893, 1995.

MULLER L. and TOUGARD C. Production and secretion of N-terminal secretogranin II derived peptides in GH3B6 prolactin cells. Mol. Cell. Endocrinol. 112 : 101-112., 1995.

VIOLLET C., FAIVRE-BAUMAN A., ZHANG J., LLORENS-CORTES C., LOUDES C., KORDON C. and EPELBAUM J. Differential expression of somatostatin receptors by quantitative PCR in the rat brain. C. R. Acad. Sci. III 318 : 851-857, 1995.

LENKEI Z., CORVOL P. and LLORENS-CORTES C. Comparative expression of vasopressin and angiotensin type 1 receptor mRNA in rat hypothalamic nuclei : a double in situ hybridization study. Mol. Brain Res. 34 : 135-142, 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.

WEN Y., CABOT M.C., CLAUSER E., BURSTEN S.L. and NADLER J.L. Lipid signal transduction pathways in angiotensin II type 1 receptor-transfected fibroblasts. Am. J. Physiol. 269, 435-C442, 1995.

PERRAUDIN V., DELARUE C., DE KEYSER Y., BERTAGNA X., KUHN J.M., CONTESSE V., CLAUSER E. and VAUDRY H. Vasopressin-responsive adrenocortical tumor in a mild Cushing syndrome : in vivo and in vitro studies. J. Clin. Endocrinol. Metab 80, 2661-2667, 1995.

CURNOW K.M., PASCOE L., DAVIES E., WHITE P.C., CORVOL P. and CLAUSER E. Alternative splicing of the human type 1-angiotensin II receptor (AT1) gene leads to a novel receptor isoform and regulates the transcriptional efficiency of the mRNA. Mol. Endocrinol. 9, 1250-1262, 1995.

JEUNEMAITRE X., MENARD J., CLAUSER E. and CORVOL P. Angiotensinogen. in « Hypertension, Pathophysiology diagnosis and management » B. M. Brenner and J.H. Laragh Edt ; Raven Press.(New York) pp1653-1666, 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.

E. CLAUSER Étude comparée de de la structure et des fonctions moléculaires des récepteurs de l'angiotensine II et de la vasopressine. *CR Soc. Biol.* 1995, 189, 179-190, 1995.

CLAUSER E., AUZAN C. and LECONTE I. Le récepteur de l'insuline. *Anal. Endocrinol.* 56, 515-22, 1995.

CLAUSER E., CURNOW K.M., CONCHON S., DAVIES E., TEUTSCH B., VIANELLO B., MONNOT C. and CORVOL P. Molecular structure and mechanisms of action of mammalian angiotensin II receptors. *Cur. Op. Endocrinol. Diab.* 2, 404-411, 1995.

CORVOL P., SOUBRIER F. and JEUNEMAÎTRE X. Molecular genetics of the renin-angiotensin-aldosterone system in human hypertension. *Cur. Op. Endocrinol. Diab.* 2 : 266-275, 1995.

JEUNEMAÎTRE X., CHARRU A., PASCOE L., GUYENE T-T., AUPETIT-FAISANT B., SHACKLETON C.H.L., SCHAMBELAN M., PLOUIN P-F. and CORVOL P. Hyperaldostérisme sensible à la dexaméthasone avec adénome surrénalien : étude clinique, biologique et génétique. *Presse Med.* 24 : 1243-1248, 1995.

VEDIE B., MYARA I., JEUNEMAÎTRE X. and MOATTI N. Variations génétiques du gène de l'apolipoprotéine B. *Ann. Genet.* 38 :187-201, 1995.

#### 1996

SRAER J-D., DELARUE F., HAGEGI J., FEUNTEUN J., PINET F., NGUYEN G and RONDEAU E. Stable cell lines of T-SV40 immortalized human glomerular mesangial cells. *Kidney Int.*49 : 267-270, 1996

CHATZIANTONIOU C., PANTI M-D., PINET F., PROMENEUR D., DUSSAULE J-C. and ARDAILLOU R. Regulation of renin release is impaired after nitric oxide inhibition. *Kidney Int.*49 : 626-634, 1996

MONNOT C., BIHOREAU C., CONCHON S., CURNOW K., CORVOL P. and CLAUSER E. Polar residues in the transmembrane domains of the type 1 angiotensin II receptor are required for binding and coupling. *J. Biol. Chem.* 271 : 1507-1513, 1996

AZIZI M., ROUSSEAU A., EZAN E., GUYENE T-T., MICHELET S., GROGNET J-M., LENFANT M., CORVOL P. and MÉNARD J. Acute angiotensin-converting enzyme inhibitor increases the plasma level of the natural stem-cell regulator N-Acetyl-Seryl-Aspartyl-Lysyl-Proline. *J. Clin. Invest.* 97 : 839-844, 1996.

GIMENEZ-ROQUEPLO A-P., LECONTE I., COHEN P., SIMON D., GUYENE T-T., CELERIER J., PAU B., CORVOL P., CLAUSER E. and JEUNEMAÎTRE X. The natural mutation Y248C of human angiotensinogen leads to abnormal glycosylation and altered immunological recognition of the protein. *J. Biol. Chem.* 271 : 9838-9844, 1996.

CLAUSER E., CURNOW K.M., DAVIES E., CONCHON S., TEUTSCH B., VIANELLO B., MONNOT C. and CORVOL P. Angiotensin II receptors : protein and gene structures, expression and potential pathological involvements. *C. Eur. J. Endocrinol.* 134 : 403-411, 1996.

GERMAIN S., KONOSHITA T., PHILIPPE J., CORVOL P. and PINET F., Transcriptional induction of the human renin gene by cyclic AMP requires cyclic AMP response element-binding protein (CREB) and a factor binding a pituitary-specific *trans*-acting factor (Pit-1) motif. *Biochem. J.* 316 : 107-113, 1996.

VAZEUX G., WANG J., CORVOL P. and LLORENS-CORTES C. Identification of glutamate residues essential for catalytic activity and zinc coordination in aminopeptidase A. *J. Biol. Chem.* 271 : 9069-9074, 1996.

VILA-PORCILE E. and BARRET A. Structural and functional differences between prolactin cells from the inner and outer zones of the male rat anterior pituitary. *Cell Tissue Res.*, 264 : 247-259, 1996.

BOUSQUET O., BASSEVILLE M., VILA-PORCILE E., BILLETTE DE VILLEMEUR T., HAUW J.J., LANDRIEU P. and PORTIER M.M. Aggregation of a subpopulation of vimentin filaments in cultured human skin fibroblasts derived from patients with giant axonal neuropathy. *Cell Motil. Cytosk.*, 33 : 115-129, 1996.

BOUBY N., BANKIR L. and LLORENS-CORTES C. Type 1 angiotensin receptor subtypes in kidney of normal and salt-sensitive hypertensive rats. *Hypertension* 27 : 392-398, 1996.

CHANSEL D., LLORENS-CORTES C., VANDERMEERSCH S. and ARDAILLOU R. Regulation of angiotensin II receptor subtypes by dexamethasone in rat mesangial cells. *Hypertension* 27 : 867-874, 1996.

MONNOT C., BIHOREAU C., CONCHON S., CORVOL P. and CLAUSER E. Polar Residues in the transmembrane domains of the AT<sub>1A</sub> angiotensin receptor are required for binding and coupling. *J. Biol. Chem.* 271 : 1507-1513, 1996.

THIBONNIER M. GRAVES M.K. WAGNER M.S., AUZAN C., CLAUSER E. & WILLARD H.F. Structure, sequence, expression and chromosomal localization of the human V<sub>1A</sub> vasopressin receptor gene. *Genomics* 31 : 327-334, 1996.

DE KEYSER Y., LENNE F., AUZAN C., JEGOU S., VAUDRY H., KUHN J.M., LUTON J.P., CLAUSER E. and BERTAGNA X. The pituitary specific vasopressin V3 receptor and the corticotrophe phenotype in ectopic ACTH syndrome. *J. Clin. Invest.* 97 : 1311-1318, 1996.

DE KEYSER Y., CLAUSER E. and BERTAGNA X. The pituitary V3 vasopressin receptor and the ectopic ACTH syndrome. *Cur. Op. Endocrinol Diab.* 3 : 125-131, 1996.

HOPKINS P.N., LIFTON R.P., HOLLENBERG N.K., JEUNEMAITRE X., HALLOUIN M-C., SKUPPIN J., WILLIAMS C.S., DLUHY R.G., LALOUEL J-M., WILLIAMS R.R. and

WILLIAMS G.H. Blunted renal vascular response to angiotensin II is associated with a common variant of the angiotensinogen gene and obesity. *J. Hypertens.* 14 : 199-207, 1996.

#### EXPOSÉS, CONGRÈS

Monsieur Pierre Corvol a participé aux congrès suivants : 13<sup>e</sup> Congrès de la Société Française d'Endocrinologie, Nancy, Août 1995 (Conférence plénière) ; National Council of High Blood Pressure, Melbourne, Décembre 1995 (Conférence plénière) ; 18th Meeting of Japanese Society of Hypertension, Tokyo, Octobre 1995 (Conférence plénière) ; Gordon Research Conference on Angiotensin, Février 1996 ; Symposium on the Genetics of Complex Cardio-Vascular Diseases, Stanford, Avril 1996 ; Seminar at the Mount Sinai Hospital, New York, Mai 1996 ; Symposium Genetics 96, Glasgow, Juin 1996. Il a donné une série de huit cours en tant qu'invité de la Ligue nationale Belge contre l'Hypertension Artérielle, en Belgique, du 11 au 16 Février 1996.

Monsieur Jean-Marie Gasc a participé à la Workshop on Recent Advances on AT<sub>2</sub> Receptor ; New York, May 1996.

Madame Mathilde Sibony a participé au 10th International Congress of Endocrinology San Francisco, June 1996.

Mademoiselle Florence Pinet a participé aux congrès suivants : Colloque de la Société de Biologie Cellulaire de France (8-10 Mars 1995) ; 77th Annual Meeting of the Endocrine Society (14-17 Juin 1995) ; Conférence J. Monod on Molecular and Cellular Mechanisms in Protein Processing (20-24 Mai 1996) ; 10th International Congress of Endocrinology (12-15 Juin 1996) ; 16th Meeting of International Society of Hypertension (23-27 Juin 1996).

Madame Claude Tougard a participé aux congrès suivants : Colloque International de Biologie Cellulaire et Développement, Paris, 5-7 Octobre 1995 et au 5<sup>e</sup> Congrès de la Société de Pharmaco-Toxicologie Cellulaire, Bordeaux, 13-15 Mars 1996.

Madame Evelyne Vila-Porcile a participé au Colloque International de Biologie Cellulaire et Développement, Paris, 5-7 Octobre 1995.

Madame Catherine Llorens-Cortes a participé aux congrès suivants : XXIV Colloque de la Société de neuroendocrinologie Expérimentale, Magag-Orford, 19-22 Septembre 1995 ; 28th Annual Meeting of the American Society of Nephrology, 5-8 Novembre 1995 ; 25th Annual Meeting of the American Society for Neuroscience, San Diego, California, 11-16 Novembre 1995 ; Xvèmes Journées de l'Hypertension Artérielle, Paris, 14-15 Décembre 1995 ; European Kidney Research Forum (EKRF), Bergamo, Italy, 24-27 Mai 1996.

Madame Catherine Llorens-Cortes a donné des séminaires en France : Club des Neurosciences de Créteil (B. Calvino) ; CNRS URA 1682, Paris (P. Cohen) ;

CEA Service de Biologie Cellulaire, Saclay (A. Doucet). A l'étranger : Université de Montréal, Canada (P. Crine) ; Max Delbrück Center, Berlin (D. Ganten) ; Semmelweis University, Budapest (M. Palkovits).

Monsieur Eric Clauser a participé aux congrès suivants : 77th Annual meeting of Endocrine Society. Washington DC, June 1995 ; C.O.E. International Symposium, Osaka, Japon, November 18th-20th 1995 ; 10th International Congress of Endocrinology, San Francisco — USA., June 1996.

Monsieur Xavier Jeunemaitre et son équipe ont participé aux congrès suivants : Xth Scientific Meeting of the American Society of Hypertension, New-York, May 17-20, 1995 ; VIIth European Meeting on Hypertension. Milan (Italy) — 9-12 June 1995 ; European Society of Cardiology. Amsterdam (The Netherlands) — August 20-24 1995 ; Journées HTA, Paris, 1995 ; Winter Gordon Conference on Angiotensin. Ventura, California. February 18-23, 1996 ; Xth International Congress of Endocrinology, San Francisco, June 11-17, 1996 ; 3rd Franco-Japanese Symposium in Nephrology, June 21-23, 1996 ; 16th Scientific Meeting of the International Society of Hypertension, Glasgow, U.K., June 23-27, 1996.

#### ENSEIGNEMENTS

Madame Claude Tougard a participé aux enseignements de DEA suivants : DEA de « Physiologie de la Reproduction » (Cours et encadrement de séminaires d'étudiants), Paris VI, Novembre 1995 ; DEA de « Biologie Cellulaire et Moléculaire » (Cours et encadrement du séminaire d'un étudiant), Paris VI, Mars 1996 ; DEA d'« Endocrinologie et Interactions Cellulaires » (séminaire méthodologique et encadrement de séminaires d'étudiants), Paris XI, Mai 1996.

Madame Catherine Llorens-Cortes a participé à l'enseignement du C2 pour la Maîtrise des Sciences Biologiques et Médicales et le Diplôme d'Université. Participation au Jury de DEA de Neurosciences Paris VI, Paris XI.

Monsieur Eric Clauser a participé aux enseignements suivants : Cours de Biochimie de 1ère (Biochimie métabolique et énergétique) et 2ème année (Récepteurs membranaires, signalisation et communication cellulaire) — Faculté de Médecine St Antoine. DEA d'endocrinologie moléculaire (Pr Milgrom) ; DEA de pharmacologie (Dr Hanoune) ; C2 d'endocrinologie (Dr Vincens). Co-responsable du DEA de Physiopathologie Moléculaire et Cellulaire (Pr Béréziat). Responsable de la direction du département de Biochimie, Biologie Moléculaire et de Biologie cellulaire de la Faculté St Antoine.

Monsieur Xavier Jeunemaitre a participé aux enseignements suivants : Participation à l'enseignement universitaire de Biologie Cellulaire à l'Université Paris VI (PCEM2). Participation aux Certificat C2 de Biologie Moléculaire et Cellulaire (Pr Chambaz) et au Certificat C'2 de Pathologie des Régulations (Pr Capeau) de l'Université Paris VI. Co-responsable du Module de Formation aux techniques de PCR organisé par l'Université Paris VI et l'INSTN. Enseignement de Gén-

tique à l'Université Paris VI (DCEM1), au module optionnel (Incidence de la génétique en pathologie) organisé à l'Hôpital Pitié-Salpêtrière pour les DCEM1, (Pr Brice), au diplôme Inter-Universitaire de Génétique Médicale organisé par le Pr Stoll à Strasbourg, au Certificat C2 de Biologie Moléculaire (Paris V), organisé par le Pr Kaplan. Communications et participations aux Journées Scientifiques organisée par plusieurs sociétés savantes françaises (ACORATA 1994-6, Société de Cardiologie 1995-96, Séminaires de Néphrologie 1996, Journées d'Endocrinologie 1996) et étrangères (Société Danoise d'HTA 1995, Société Portugaise d'Endocrinologie 1995) Communication et participation à l'enseignement de l'École Européenne d'hypertension artérielle, Madrid 1995 (Pr Ganten, Pr Ménard).

#### LISTE DES DIPLÔMÉS

##### DEA

Frédéric Lezot : Septembre 1995. *Étude de la régulation de l'expression de l'enzyme de conversion de l'angiotensine I par les glucocorticoïdes et la triiodothyronine.*

Claire Tournois : Septembre 1995. *Réalisation de différentes lignées de rats et de souris transgéniques pour le gène humain de l'enzyme de conversion de l'angiotensinogène.*

Hervé Kempf : DEA d'Endocrinologie Moléculaire et Cellulaire (Paris XI), Septembre 1995. *Clonage, séquençage et caractérisation d'un récepteur de l'angiotensine II de Poulet.*

Peggy Masdehors : DEA de Pharmacochimie Moléculaire, Pharmacologie Expérimentale et Métabolisme (Paris V), Septembre 1995 *Rôle physiologique de l'aminopeptidase A dans le système nerveux central.*

Nathalie Béressi : Septembre 1995. *Contribution à l'étude du rôle des protéines G hétérotrimériques dans le processus sécrétoire de la prolactine.*

Florence Torremocha : DEA de Physiopathologie Cellulaire et Moléculaire (Paris VI). 1995. *Analyse du gène de la kallicréine rénale et de ses relations avec l'excrétion urinaire de kallicréine et l'hypertension artérielle humaine.*

##### Thèse

Laurent Muller : *Le transport intracellulaire de la prolactine et de la sécrétogranine II dans des cellules antéhypophysaires en culture. Etude de l'implication de protéines G hétéro-trimériques*, 19 Février 1996.

Xavier Jeunemaitre : Thèse de Doctorat Spécialité : Génétique Humaine (Paris VII) Soutenue le 6 Mai 1996. *Aspects Génétiques de l'Hypertension Artérielle Essentielle : Analyse du Système Rénine-Angiotensine et en Particulier de son substrat l'Angiotensinogène.*