

## Médecine expérimentale

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

### 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 CARDIOVASCULAIRE*

Équipe : F. PINET, S. GERMAIN, F. BONNET, S. FUCHS, J. PHILIPPE, J.-M.  
LE MOULLEC (départ en mai 1997), P. KORTH (départ en août 1997), G. EGIDY

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 de la régulation de la transcription du gène de la rénine et l'étude structure/fonction de l'enzyme de conversion de l'endothéline.

#### **Thème 1 : Étude de la régulation de la transcription du gène de la rénine humaine**

##### *A. Régulation et expression de l'ARNm de la rénine*

La quantification des ARNm rénine chez le rat et l'homme a été effectuée par RT/PCR. cette technique de mesure a été utilisée pour déterminer la présence du mRNA rénine dans des cultures de cellules humaines mésangiales immortalisées (collaboration avec F. Delarue et J. D. Sraer, INSERM U64).

En collaboration avec Cristos Chatziantoniou (INSERM U64), nous avons étudié les effets de l'inhibition du NO sur la synthèse de rénine par les artérioles

afférentes fraîchement isolées de rein de rat. Nous avons montré que le mécanisme régulant la synthèse de rénine par l'intermédiaire de l'adénylate cyclase était altéré de façon réversible quand la synthèse de NO était inhibée.

#### B. *Quantification de l'ARNm codant pour la vasopressine et l'ocytocine par RT/PCR*

Nous avons étudié le rôle du système rénine-angiotensine central dans certaines conditions physio-pathologiques (restriction hydrique) sur les taux de mRNA codant pour la vasopressine. La quantification des messagers codant pour la vasopressine (AVP) et l'ocytocine (OT) par RT-PCR a été mise au point au laboratoire avec l'utilisation du même standard interne pour les deux messagers. Nous avons montré qu'une restriction hydrique stimulait 3 fois le mRNA AVP et 1,7 fois le mRNA OT au niveau de l'hypothalamus. La gestation, quant à elle, n'influence que les taux de mRNA OT au niveau de l'hypothalamus (3 fois) et au niveau de l'utérus (38 fois), les mRNA AVP restant indétectables dans l'utérus bien que la sensibilité de la détection soit de 75 ng d'ARN total.

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

Deux modèles de cellules productrices de rénine sont à notre disposition : les cellules chorioniques et la lignée Calu-6 dérivées d'un carcinome pulmonaire. L'analyse fonctionnelle *ex vivo* du promoteur de la rénine et l'identification des séquences *cis* a été effectué en utilisant des cellules d'origine extra-rénale (cellules chorioniques). Il était donc nécessaire de déterminer si les facteurs transcriptionnels identifiés ci-dessus étaient présents dans le rein, qui est le principal site de synthèse de la rénine. Nous avons montré que les mêmes facteurs de transcription nucléaires d'origine chorionique et rénale se fixaient sur le promoteur proximal de la rénine humaine, validant le modèle des cellules chorioniques pour étudier l'activité du promoteur du gène de la rénine humaine.

Nous nous sommes particulièrement intéressés à déterminer les séquences intervenant dans la régulation par l'AMPc du gène de la rénine. Nos résultats ont montré que le facteur CREB et un autre facteur, différent de Pit-1, agissent de concert pour produire une réponse complète à l'AMP cyclique.

Le clonage récent au laboratoire de 15 Kb du promoteur de la rénine humaine ainsi que du premier intron ouvrent de nouvelles perspectives pour identifier les régions régulatrices du gène :

a) Analyse fonctionnelle du promoteur de la rénine. L'analyse des nouvelles régions, telles que le 1<sup>er</sup> intron, sera effectuée par transfection pour déterminer les séquences nucléotidiques précisément impliquées. 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 -5 kb du site d'initiation de la transcription et sera précisé ultérieurement grâce aux différents fragments des 15 kb du promoteur. La même approche sera utilisée avec les cellules Calu-6 et As4.1 (lignée de cellules juxtaglomérulaires de souris). c) Rôle du calcium. L'étude fonctionnel du nCaRE, présent dans le promoteur de la rénine, sera étudié en faisant varier la concentration de Ca intracellulaire à l'aide de la ionomycine. d) Caractérisation du promoteur de la rénine humaine par transgénèse. 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.

## **Thème 2 : Étude de la structure/fonction de l'enzyme de conversion de l'endothéline**

L'étude de la structure/fonction de l'enzyme de conversion de l'endothéline humaine (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).

### *Mise au point d'outils et de modèles*

Nous avons exprimé les deux isoformes de l'ECE-1 en cellules CHO. Nous avons construit et caractérisé une forme soluble (ECEs) (dépourvue du domaine d'ancrage à la membrane). Elle a une activité similaire à l'ECE-1a et est sécrétée principalement sous forme de monomère. Des anticorps ont été obtenus contre des peptides différenciant l'isoforme a de l'isoforme b et contre des peptides situés sur la partie commune C-terminale de la molécule, tous spécifique de l'ECE. L'expression de l'ECEs sera réalisée aussi dans la levure *Pichia Pastoris* et des anticorps contre la protéine native (ECEs) seront préparés pour la mise au point d'un dosage direct de l'ECE humaine.

### *Mutagenèse dirigée et recherche d'inhibiteurs*

Les acides aminés impliqués dans le site actif et les sites de glycosylation importants pour l'expression de l'ECE seront caractérisés. En utilisant les banques de peptides phosphiniques développés par chimie combinatoire, nous essayons de développer des inhibiteurs spécifiques de l'ECE. Enfin, 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 (tumeurs surrenaliennes, tumeurs du colon (carcinome) et tumeurs du rein (sarcome)).

## II — PEPTIDES — HORMONES ET DÉVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE

Équipe : J.-M. GASC, C. HUBERT, M. SIBONY, H. KEMPF, C. LINARES,  
M.-T. MORIN, F. MONGIAT

A. *Ontogénèse de deux systèmes de peptides-hormones :  
système rénine-angiotensine et endothéline*

1. *Système rénine-angiotensine*

L'étude de l'ontogénèse des composants du système rénine-angiotensine dans l'embryon humain de 3 à 6 semaines a été achevée (Schütz et al. 1996). Ce travail montre la précocité de l'expression des divers composants de ce système (propeptide précurseur du ligand, enzymes de maturation et récepteurs), à un stade et avec une distribution tissulaire qui ne sont pas en rapport avec un rôle dans la régulation de l'équilibre hydrominéral ou de la tension artérielle. Ce résultat, qui reproduit celui précédemment obtenu sur l'embryon et le fœtus de rat, suggère davantage un rôle lié à la croissance ou à la différenciation fonctionnelle des tissus et organes au cours du développement fœtal plutôt qu'à l'homéostasie hydrominérale comme chez l'adulte. La conséquence pratique de cette étude est de souligner les risques graves de malformations en cas d'utilisation des antagonistes des récepteurs de l'angiotensine au cours de la grossesse et en particulier pendant les premières semaines. Cet avertissement est utile au moment où certains de ces antagonistes sont en cours d'essai clinique en vue d'utilisation thérapeutique.

2. *Système endothéline*

Au cours des deux ou trois dernières années plusieurs travaux convergents ont montré le rôle critique joué par les endothélines dans certaines pathologies congénitales chez l'homme. Ces phénotypes anormaux correspondent à des mutations des endothélines ou de leurs récepteurs, qui sont retrouvés chez la souris et le rat porteurs de mutations spontanées ou induites produisant l'inactivation des mêmes gènes. Ces différents phénotypes anormaux ont été imputés à une participation défectueuse des cellules de crêtes neurales à la différenciation des structures affectées. Ainsi un lien direct a été démontré entre d'une part un défaut des effets des endothélines sur les cellules de crête neurale, ou leurs dérivés, et d'autre part des malformations cranio-faciales et cardio-vasculaires. Une relation semblable a été établie entre un défaut du système endothéline, les crêtes neurales et des anomalies de pigmentation ainsi qu'une agangliogénèse colonique terminale.

Afin de préciser les interactions entre endothélines et crêtes neurales, nous avons entrepris une étude complète de l'ontogénèse des composants du système endothéline dans l'embryon humain entre trois et six semaines de gestation, c'est à dire la période pendant laquelle les cellules de crêtes neurales émigrent du tube



neural et se dirigent vers leurs sites cibles. Nous avons établi, par hybridation *in situ*, une cartographie complète des ARNm des endothelines 1 (ET1) et 3 (ET3), de l'enzyme de conversion (ECE-1), et des récepteurs (ETA et ETB). Dès le début de l'émigration des cellules des crêtes neurales, les cellules quittant le tube neural expriment les récepteurs ETA et ETB. Puis, au niveau des somites, les cordons de cellules se séparent en deux voies : la voie latérale sous l'ectoderme, dont les cellules expriment seulement l'ETA, et la voie ventro-médiane, dont les cellules expriment seulement l'ETB. Cependant, malgré cette apparente spécificité tissulaire, dès la première expression des récepteurs dans les cellules de crêtes neurales on doit noter que des cellules autres que celles provenant des crêtes neurales sont aussi positives pour l'un ou l'autre récepteur. Par exemple, l'épithélium pharyngien exprime le récepteur ETA, et l'endocarde le récepteur ETB. Ainsi, même si les endothélines jouent un rôle important *in vivo* dans le devenir des lignées dérivées des crêtes neurales, ces peptides exercent probablement leurs effets sur d'autres populations de cellules.

Après la séparation en deux voies de migration, les cellules de crêtes neurales vont diversifier leurs phenotypes et progressivement se différencier de façon fonctionnelle. Dans presque tous les cas on peut observer qu'elles restent cibles pour une endothéline jusqu'à la fin de leur migration. Les endothélines elles-mêmes et l'ECE-1 sont détectées un peu plus tardivement que les récepteurs mais on ne peut exclure que cela reflète plus un niveau inférieur non détectable d'expression qu'une réelle absence de ligand alors que les récepteurs sont déjà exprimés.

On peut résumer ainsi les observations les plus importantes faites sur l'embryon humain de trois à six semaines de gestation : ET1 est exprimée principalement dans l'endothélium vasculaire et cardiaque et dans les cellules musculaires lisses de la paroi vasculaire, mais c'est le récepteur ETB qui est exprimé dans l'endothélium et le récepteur ETA dans les muscles lisses. Dans le tube neural, les ganglions sensoriels, la chaîne sympathique, et dans le système nerveux enterique le récepteur ETB est presque le seul exprimé. L'expression de ET3 dans le mesoderme du tube digestif au sein duquel les cellules dérivées des crêtes neurales migrent et finalement s'établissent pour former les ganglions du système nerveux enterique fournit pour la première fois une explication du rôle des endothélines dans la différenciation de ces ganglions. L'ET3 produite dans le mesoderme peut agir de façon paracrine pour activer le récepteur ETB des cellules pré-ganglionnaires et entraîner leur différenciation ganglionnaire. Cette induction est probablement un effet indirect sur la prolifération ou/et la migration des cellules de crêtes neurales. La localisation des endothélines et de leurs récepteurs dans les deux exemples précédents illustrent clairement l'hypothèse d'un rôle paracrine ou même autocrine des ligands et permettent d'exclure un rôle de type hormonal à distance. En effet, lorsque le gène de l'ET3 est inactivé, la gangliogénèse terminale, du colon ne peut pas s'achever bien que de l'ET1 soit produite, et probablement sécrétée, non loin de là dans l'artère mésentérique. Malgré cela l'ET1

ne peut se substituer à l'ET3 déficient pour activer le récepteur ETB dans les cellules pré-ganglionnaires. Dans le cas des gros vaisseaux dérivant des arcs aortiques, l'ET1 déficient ne peut pas être remplacé pour ses effets sur l'endothélium ou les cellules musculaires lisses par l'ET3 produit dans le mesoderme. C'est donc localement que l'on doit envisager les effets des endothélines et non pas à distance comme on l'attend d'une hormone.

### 3. Les récepteurs de l'angiotensine et des endothélines de poulet

La caractérisation du récepteur de l'angiotensine II de poulet a été complétée dans le but de sélectionner des antagonistes et de pouvoir ainsi étudier les effets du blocage de ce récepteur au cours du développement embryonnaire du poulet. Il apparaît que ce récepteur de poulet, dénommé ATp, ne peut pas être facilement classé selon les types utilisés pour les récepteurs de mammifères. Sa distribution tissulaire dans l'embryon ou l'adulte, et sa spécificité de liaison pour les ligands synthétiques ne correspondent ni à un récepteur de type 1 ni à un récepteur de type 2. Par exemple, dans les vaisseaux l'ATp est exprimé dans l'endothélium et semble absent des muscles lisses. Quant aux ligands synthétiques aucun de ceux utilisés chez les mammifères ne se lie à l'ATp à une concentration physiologique. A ces différences entre l'ATp et les récepteurs de mammifères s'ajoute le fait qu'il n'y a pas d'évidence directe de l'existence d'un second récepteur de l'angiotensine II chez le poulet. Il apparaît que le poulet n'est sans doute pas le bon modèle expérimental pour étudier les effets de l'angiotensine II sur le développement et nous nous intéressons maintenant au système endothéline dans le but de reproduire les malformations imputables, chez la souris et l'homme, à une déficience d'un des composants du système endothéline et d'en expliquer le mécanisme.

### B. Souris déficientes pour un gène du système rénine-angiotensine-aldostérone

L'obtention de souris, dont le gène de l'enzyme de conversion de l'angiotensine I (ACE) a été inactivé, a permis de découvrir que cette enzyme contrôlait la fertilité masculine ; toutefois ce rôle n'implique pas la maturation d'angiotensine I en angiotensine II. En effet, les souris dont le gène de l'angiotensinogène est inactivé, et qui ne produisent donc pas d'angiotensine, sont normalement fertiles. Une étude sur cette lignée de souris mutante pour le gène de l'ACE nous a permis de confirmer que les testicules de souris ACE<sup>-/-</sup> sont apparemment normaux en ce qui concerne l'histologie générale et la maturation des spermatozoïdes, mais évidemment n'expriment pas l'ACE.

Cette souche de souris nous a permis de faire une observation surprenante, mais qui explique un résultat inattendu de la transmission de l'allèle ACE<sup>-</sup>. Les chercheurs qui ont développé cette souche ont remarqué, sans pouvoir l'expliquer, la transmission avec une égale fréquence de l'allèle ACE<sup>-</sup> et de l'allèle ACE<sup>+</sup> par les animaux hétérozygotes ACE<sup>+/-</sup>. Ce résultat semblait contradictoire avec

la très forte hypofertilité des spermatozoïdes ACE<sup>-</sup> des animaux homozygotes ACE<sup>-/-</sup>. Nous avons montré que l'ACE est détectable (ARNm par hybridation *in situ* et protéine par immunodétection) dans toutes les spermatides des heterozygotes et pas seulement dans les spermatides ACE<sup>+</sup>. Puisque chez ces animaux l'allèle ACE<sup>-</sup> est transmis aussi bien que l'ACE<sup>+</sup> il faut admettre que l'ARNm, et aussi probablement la protéine, passent d'une cellule ACE<sup>+</sup> à sa voisine ACE<sup>-</sup> qui devient ainsi fertile et transmet l'allèle ACE<sup>-</sup> qui devrait être stérile sans cet apport externe d'ACE. Ce passage peut facilement se produire par des pores entre cellules germinales dont l'existence avait déjà été décrite. De plus, nous avons observé que le niveau d'ARNm et de protéine reste inférieur dans toutes les spermatides des heterozygotes ACE<sup>+/-</sup> par rapport aux homozygotes ACE<sup>+/+</sup>. Cela signifie que d'une part il y a passage d'une cellule à l'autre et que d'autre part il n'y a pas de régulation pour compenser la fuite de l'ACE des spermatides ACE<sup>+</sup> vers les spermatides ACE<sup>-</sup>.

Deux autres études sont en cours, l'une chez des souris déficientes en récepteur des minéralo-corticoïdes, et l'autre chez des souris qui ne produisent pas d'angiotensinogène. Ces souris permettent d'étudier les régulations par rétro-contrôle des composants du système suivant la suppression de l'une des deux boucles du système. Enfin, une étude sur les souris déficientes en récepteur de l'angiotensine de type 2 (AT<sub>2</sub>) a été commencée pour vérifier quel rôle peut jouer ce récepteur au cours du développement embryonnaire et fœtal, période pendant laquelle il est fortement exprimé.

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

Équipe : M.T. CHAUVET, A. MICHAUD, T. WILLIAMS (départ en juillet 1997), D. COATES, X. HOUARD

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. Chez les insectes, une forme homologue soluble ne contenant qu'un seul site actif (AnCE) a été caractérisée chez la drosophile, *drosophila melanogaster*. Nous cherchons actuellement :

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

c) à déterminer le rôle, au cours du développement, des deux isoformes de l'ECA, chez la drosophile. En effet, deux gènes homologues à l'ECA ont été identifiés chez la drosophile, *drosophila melanogaster*, et correspondent à deux protéines présentant 74 % d'homologie de séquence primaire en aminoacides : AnCE et ACeR.

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 $\beta$  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 été découvert. L'ECA serait ainsi impliquée, par l'intermédiaire de son domaine N-terminal, *in vitro* et *in vivo* dans la régulation de l'hématopoïèse.

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 ont été produites et les nouveaux substrats sont en cours d'étude.

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

Étant donné le rôle du domaine N-terminal de l'ECA dans la dégradation du peptide AcSDKP il est important de trouver des inhibiteurs spécifiques de ce

domaine pour leur administration, lors de chimiothérapie, afin d'augmenter *in vivo* la stabilité de ce peptide qui maintiendra en phase quiescente les cellules souches hématopoïétiques durant le traitement cytotoxique. Nous avons effectué 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 et que 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 démontré que des trois inhibiteurs testés le captopril est le seul à présenter une certaine sélectivité pour l'inhibition de AcSDKP comparée à celle de l'angiotensine I sur l'ECA somatique. La valeur du  $K_i$  déterminée avec AcSDKP comme substrat est 50 fois inférieure à celle déterminée avec l'angiotensine I comme substrat. 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. Comparaison des deux isoformes d'ECA chez *Drosophila melanogaster*

Les deux isoformes de l'ECA issues de deux gènes distincts ont été exprimées dans le système de levure, *Pichia pastoris*, et ces deux enzymes solubles correspondant à des glycoprotéines d'environ 74 kDa de masse moléculaire, AnCE et ACEr, sont actuellement comparées sur le plan enzymatique, immunologique et sur leur rôle respectif au cours du développement de la nymphe. Nous avons, précédemment montré que AnCE a des caractéristiques enzymatiques qui la rapproche plus du domaine C-terminal actif de l'ECA somatique des mammifères. Toute cette étude est faite en collaboration avec le Pr. R.E Isaac (Université de Leeds).

#### C. 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 le groupe de cristallographes de Bristol-Myers-Squibb, 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 le 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 mutagenèse dirigée des résidus d'asparagine 53, 196, et 311. Une protéine homogène a été obtenue sans altération majeure de stabilité et qui conserve les propriétés enzymatiques de la protéine sauvage. La finalité de ce projet est la détermination de la structure tertiaire de l'ECA de drosophile (AnCE) puis, par modélisation moléculaire, l'extrapolation des résultats aux domaines N et C de l'ECA humaine.

#### D. 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 somatique exprimé dans la levure *Pichia pastoris* est relargué dans le milieu de culture. La TNF $\alpha$  convertase ou TACE (TNF $\alpha$  converting enzyme) vient d'être clonée simultanément par R.A Black et son groupe d'une part et M.L. Moss et *al.* (Nature 385, 1997, 729-736). Cette métalloenzyme ancrée à la membrane plasmique fait partie de la famille des adamalysines ou ADAMs, qui se caractérise par la présence d'un domaine disintégrine (**A Disintegrin And Metalloprotease domain**). Il convient de vérifier si la sécrétase de l'ECA s'identifie à TACE ou à une ADAM homologue.

#### E. Évolution de l'ACE

Ayant déjà montré que l'ACE de drosophile ne possède qu'un seul site actif, comme l'ACE testiculaire humaine, nous avons voulu savoir le moment dans la phylogénèse où la forme à deux domaines est apparue. Afin de savoir si la duplication était ancienne, nous avons recherché si elle était présente ou non chez tous les coelomates. Si la duplication était récente, apparaissant dans la lignée des chordates, il devrait y avoir une duplication dans la lignée menant aux drosophiles puisqu'il a été découvert récemment un deuxième ACE de drosophile, l'ACER.

Des études biochimiques ont montré que la forme possédant deux sites actifs est apparue pour la première fois chez les tunicates et qu'elle n'existe pas chez

les cephalochordates, deux étapes à l'origine de la lignée des chordates. Nous avons alors ciblé nos recherches sur deux organismes de ces groupes : *Branchiostoma lanceolatum* (amphioxus), un cephalochordate, et *Ciona intestinalis*, un tunicate. En utilisant les bases de données de séquences protéiques et nucléiques, nous avons construit des amorces qui correspondaient à des séquences très homologues avec le site actif. Ensuite, nous avons utilisé ces amorces pour amplifier des fragments d'ADNc purifié de *Branchiostoma lanceolatum* et de *Ciona intestinalis*. Dans les deux cas, les clones que nous avons isolés avaient une haute homologie avec l'ACE. Nous avons utilisé ces clones comme sondes pour cribler des banques d'ADNc et d'ADN génomique de *Branchiostoma floridae*, des banques d'ADN génomique de deux autres espèces de tunicates (*Styela clava* et *Molcula oculata*), et une banque d'ADNc provenant de *Ciona intestinalis*. Seule la banque génomique de *B. Floridae* a donné des clones positifs. Par conséquent, nous avons repris les expériences autrement. Nous avons extrait de l'ARN total de *B. Lanceolatum* et de *Ciona intestinalis* et nous l'avons utilisé pour faire de l'ADNc Marathon, une méthode qui permet l'amplification de l'ARN messager complet à partir de petits morceaux de séquences au milieu du message, que nous avons déjà identifié après les premières expériences de PCR. Ce protocole nous a d'abord fourni les extrémités 3' et 5', puis le messager complet a été construit à partir de *B. Lanceolatum*. Cet ADNc a été complètement séquencé et contient la structure codante pour une protéine de 684 acides aminés, avec un peptide signal N-terminal, une queue transmembranaire au niveau C-terminal et un site actif tout-à-fait identiques à ceux des ACEs déjà connues. Des comparaisons phylogénétiques avec les autres ACEs ont montré qu'il s'agit bien d'une nouvelle ACE et que l'alignement des séquences entre les vertébrés et les invertébrés est correct. Actuellement cet ADNc est exprimé en cellules COS et dans la levure *Pichia pastoris* afin d'étudier les propriétés enzymatiques de la protéine.

Afin de connaître le nombre des copies de ce gène, l'ADNc sera utilisé comme sonde pour cribler l'ADN génomique digéré avec des enzymes de restriction. Afin que les données soient précises, une carte de restriction des environs du gène sera établie : la copie génomique est en train d'être clonée par PCR dans ce but. De plus, nous avons obtenu des fragments du gène de l'ACE de *C. intestinalis* qui indique qu'il y a deux copies d'ACE dans les tunicates.

#### IV — ÉTUDE DU TRAFIC INTRACELLULAIRE DES MOLÉCULES DES SYSTÈMES RÉNINE-ANGIOTENSINE ET ENDOTHÉLINE

Équipe : C. TOUGARD, E. VILA-PORCILE, A. BARRET, R. PICART (départ en janvier 1997)

Avant d'aborder l'analyse dynamique du transit intracellulaire des molécules des systèmes rénine-angiotensine et endothéline dans les cellules endothéliales et

les cellules antéhypophysaires et son implication fonctionnelle sur la régulation de la pression artérielle, ce groupe a poursuivi ses investigations sur la distribution subcellulaire de plusieurs de ces composants dans plusieurs modèles cellulaires.

#### A. *Le système rénine-angiotensine dans les cellules de l'antéhypophyse du rat*

Les travaux publiés dans la littérature, depuis plusieurs années, ont indiqué que plusieurs protéines nécessaires à la biosynthèse d'angiotensine II ainsi que leurs ARN messagers sont présents dans l'antéhypophyse, suggérant l'existence d'un système rénine-angiotensine local complet dans l'hypophyse. Cependant, les données publiées n'étaient pas toujours convergentes quant à l'identification des types cellulaires concernés. Nous avons donc recherché si un ou plusieurs type(s) cellulaire(s) particulier(s) ou tous les types cellulaires de l'antéhypophyse du rat étaient impliqués dans l'élaboration d'un système rénine-angiotensine complet. Nous avons, dans un premier temps, recherché par immunocytochimie ultrastructurale la distribution subcellulaire d'angiotensinogène, de prorrénine et de rénine et identifié par des doubles ou des triples marquages à l'or colloïdal les types cellulaires concernés. Les résultats obtenus indiquent clairement que ces trois composants sont colocalisés dans la plupart des grains de sécrétion de tous les types cellulaires de l'antéhypophyse du rat et qu'ils sont particulièrement abondants dans les cellules à prolactine et gonadotropes.

Ces travaux sont poursuivis actuellement par la détection d'autres composants du système (enzyme de conversion de l'angiotensine et angiotensine II), dans l'antéhypophyse du rat et dans des cellules à prolactine de rat en lignée continue, les cellules GH3B6. Les techniques d'immunomarquage à l'or colloïdal ont permis, sur le tissu hypophysaire, une quantification de ces composants dans les grains de sécrétion des différents types cellulaires, précisant l'importance du contenu en rénine des cellules à prolactine et gonadotropes et en angiotensine II des cellules somatotropes. L'immunoperoxydase, appliquée aux cellules GH3B6, a montré la présence de prorrénine dans l'appareil de Golgi. Celle-ci serait sécrétée, au moins à faible niveau, de même que la rénine et l'angiotensine II, ainsi que le montrent les premiers résultats obtenus sur ces cellules par la technique du « reverse hemolytic plaque assay » (RHPA) qui permet de mesurer la libération d'une protéine à l'échelle d'une cellule. Ces mêmes techniques d'immunoperoxydase et de RHPA doivent être appliquées à des cellules dispersées à partir d'antéhypophysés normales.

#### B. *Le système endothéline dans les cellules endothéliales et les cellules anté-hypophysaires*

L'endothéline 1 (ET-1), qui est un peptide vasoconstricteur puissant, est synthétisée sous la forme d'une molécule précurseur inactive qui subit plusieurs étapes de maturation avant de donner naissance au peptide actif. 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 une métalloprotéase membranaire, l'enzyme de conversion de l'endothéline (ECE-1). On sait que les cellules endothéliales expriment l'ECE-1 et libèrent l'ET-1, mais les informations relatives à la distribution subcellulaire précise de l'ECE-1 et au site subcellulaire de maturation de la big ET-1 endogène font encore l'objet de controverses.

Au cours de l'année écoulée, nous avons donc effectué une étude approfondie de la distribution subcellulaire de l'ECE et du site de maturation de la big ET-1 dans plusieurs modèles cellulaires en culture, à l'aide de techniques immunocytochimiques (immuno-fluorescence, immunoperoxydase électronique, immunomarquage à l'or colloïdal) et immunochimiques avec, d'une part, des anticorps dirigés contre des peptides spécifiques respectivement du domaine cytoplasmique ou du domaine luminal/extracellulaire de l'ECE-1 et, d'autre part, des anticorps spécifiques respectivement de la big ET-1 et de l'ET-1.

*a) Le système endothéline dans des lignées de cellules endothéliales*

Les résultats qui ont été obtenus dans les cellules endothéliales hybrides humaines de la lignée EAhy 926 indiquent clairement que : 1. l'ECE-1 est exprimée à un taux suffisant dans ces cellules pour être détectée avec les techniques utilisées, 2. l'enzyme est localisée au niveau de structures de l'appareil de Golgi (structures mises en jeu dans le processus sécrétoire), au niveau de la membrane plasmique et au niveau de structures endosomales et de corps multivésiculaires (structures mises en jeu dans le phénomène d'endocytose). Une distribution similaire, quoique plus abondante, de l'ECE-1 est observée dans des cellules CHO transfectées avec le cDNA codant pour l'ECE-1a humaine, ce qui indique que l'adressage de l'enzyme est le même dans les deux modèles expérimentaux. Ces informations suggèrent un transit intracellulaire rapide de l'ECE-1 entre son site de synthèse et la surface cellulaire et suggèrent également que l'enzyme est soumise à un processus d'internalisation. Étant donné les implications fonctionnelles importantes de ces observations, nous envisageons d'effectuer une étude dynamique de l'expression de l'ECE-1 à la surface des cellules.

Par contre, les informations recueillies pour l'instant ne permettent pas de définir avec certitude le site subcellulaire précis de maturation de la big ET-1, mais suggèrent cependant que ce site serait très tardif au cours du transport du peptide entre l'appareil de Golgi et la membrane plasmique.

*b) Le système endothéline dans les cellules antéhypophysaires*

Outre son expression dans les cellules endothéliales, l'ECE a été détectée dans d'autres types de cellules sécrétrices et la présence de peptides de la famille des endothélines a été démontrée dans le cerveau et différentes glandes endocrines, comme l'antéhypophyse où ET-1 et ET-3 régulent la libération de certaines hormones.

Nous avons donc recherché, avec les mêmes outils immunologiques et les mêmes approches, l'expression et la localisation de l'ECE-1 dans un modèle de cellules à prolactine de rat en lignée continue, les cellules GH3B6. Nous avons constaté que l'enzyme était exprimée dans ces cellules et que sa distribution subcellulaire était équivalente à celle que nous avons obtenue dans les cellules endothéliales, quoique l'intensité de l'immunomarquage soit plus faible. Nous poursuivons actuellement le même type d'analyse sur l'antéhypophyse du rat, afin de rechercher si l'ECE est exprimée par tous les types cellulaires de l'antéhypophyse et de définir ainsi le rôle que l'enzyme pourrait jouer dans une production locale d'endothélines.

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, A.M. NUYT, G. VAZEUX, A. REAUX, X. ITURRIOZ, A. HUS-CITHAREL, N. DE MOTTA

L'angiotensine II (AngII) et l'angiotensine III (AngIII), deux composants du système rénine-angiotensine cérébral (SRA), ont la même affinité pour les récepteurs angiotensinergiques de type 1 (AT<sub>1</sub> a et b) ou de type 2 (AT<sub>2</sub>). Injectées par voie intracérébroventriculaire, ces deux peptides augmentent la pression artérielle, le comportement dipsique et la sécrétion de vasopressine (AVP). Notre objectif consiste à étudier : 1) les enzymes impliqués dans le métabolisme des angiotensines et plus particulièrement l'aminopeptidase A (APA) qui convertit l'AngII en AngIII, 2), les rôles respectifs de ces deux peptides dans le contrôle central des fonctions cardiovasculaires, 3) le sous-type de récepteur impliqué dans les différentes actions biologiques de ces peptides.

A. *Ectoenzymes et métabolisme de l'AngII et de l'AngIII*

1 — *Étude du rapport structure/fonction de l'aminopeptidase A par mutagenèse dirigée et expression dans les cellules eucaryotes : recherche des acides aminés impliqués dans la stabilisation de l'état de transition*

L'aminopeptidase A (APA, EC 3.4.11.7) est une ectoenzyme homodimérique de type II, qui possède la séquence consensus HEXXH caractéristique des métalloprotéases à zinc (gluzincines). Cette enzyme clive *in vitro* les résidus acides (glutamate ou aspartate) en position N-terminale des peptides, comme l'angiotensine II. En l'absence de données cristallographique sur l'APA et sur les aminopeptidases, on connaît peu de chose sur l'organisation du site actif de ces enzymes. Par comparaison avec la thermolysine, une endopeptidase à zinc dont la structure et l'organisation du site actif sont connues, nous avons tenté de caractériser certains acides aminés impliqués dans l'activité enzymatique.

A partir d'un alignement multiple de séquences entre l'APA, différentes aminopeptidases et la thermolysine, nous avons mis en évidence une séquence très conservée dans toutes les aminopeptidases : la séquence *YXXKG*. De plus, nous avons mis en évidence par modifications chimiques au N-acétylimidazole la présence d'un résidu pouvant être une tyrosine dans le site actif de l'APA. Nous avons donc remplacé cette tyrosine (Tyr 471 pour l'APA) par une phénylalanine par mutagenèse dirigée puis exprimé les protéines mutantes dans des cellules eucaryotes. Nous avons montré l'importance de ce résidu dans l'activité enzymatique : alors que l'affinité de l'enzyme pour le substrat n'est pas modifiée ( $K_m$  identique), la constante catalytique ( $k_{cat}$ ) chute de trois ordres de grandeur, impliquant que ce résidu intervient dans l'acte catalytique. Afin de déterminer son rôle précis dans la catalyse enzymatique de l'APA, différents inhibiteurs de l'enzyme ont été testés, dont l'un, le  $\text{GluPO}_3\text{H}_2$ , a la particularité d'être un analogue de l'état de transition. La chute de son pouvoir inhibiteur pour le mutant caractérise l'implication de cette tyrosine 471 dans la stabilisation de l'état de transition.

## 2 — Rôles physiologiques de l'aminopeptidase A et de l'aminopeptidase N dans le métabolisme des angiotensines 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 développé dans le laboratoire de B. Roques (INSERM U266) par M.C. Fournié-Zaluski, en collaboration avec notre équipe. Trois 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) ainsi que la méthioninethiol (PC18) sélectifs de l'APN. Ces molécules ont été injectées dans le cerveau de souris afin d'étudier leur activité *in vivo* sur le métabolisme de l'AngII et de l'AngIII.

Nous avons ainsi montré que l'EC33 augmentait de façon significative la demi-vie de l'AngII et bloquait la formation d'AngIII, tandis que l'EC27 et le PC18 ralentissaient fortement le métabolisme de l'AngIII et prolongeaient sa durée de vie dans le cerveau. Ces expériences mettent en évidence l'activité respective de l'APA et de l'APN dans le métabolisme de l'AngII et l'AngIII.

### B. Étude des rôles respectifs de l'AngII et de l'AngIII dans le contrôle central de la sécrétion de vasopressine et de la pression artérielle

L'AngII et l'AngIII, injectées par voie intracérébroventriculaire (icv), provoquent une sécrétion de vasopressine et une augmentation de la pression arté-

rielle équivalentes. Le but de ce travail est de déterminer les rôles respectifs de ces deux peptides dans le contrôle central de ces fonctions. L'utilisation des inhibiteurs spécifiques nous a permis de bloquer *in vivo* sélectivement les voies métaboliques de l'AngII et de l'AngIII et d'étudier séparément le rôle de chaque peptide.

### *1 — Contrôle central de la sécrétion de vasopressine*

Après injection icv de l'AngII ou de l'AngIII en présence ou en l'absence des inhibiteurs, nous avons, d'une part mesuré les taux de vasopressine plasmatiques par RIA, d'autre part étudié directement l'activité des neurones vasopressinergiques en effectuant des enregistrements unitaires des neurones magnocellulaires vasopressinergiques dans le noyau supraoptique. Nous avons ainsi montré que l'EC33 était capable pendant plusieurs minutes de bloquer totalement l'activité des neurones vasopressinergiques et d'inhiber la sécrétion de vasopressine. Ces résultats indiquent que l'AngII doit être convertie en AngIII ou un autre métabolite pour induire la sécrétion de vasopressine. A l'inverse, l'inhibition de l'APN par le PC18 provoque une augmentation de l'activité neuronale et une sécrétion de vasopressine, celle-ci étant bloquée par la co-administration d'un antagoniste des récepteurs angiotensinergiques, la saralazine. Ces résultats indiquent que, sous l'action de l'inhibiteur de l'APN, le PC18, l'AngIII endogène s'accumule et induit une sécrétion de vasopressine par le biais des récepteurs angiotensinergiques.

### *2 — Contrôle central de la pression artérielle*

Après avoir injecté l'AngII ou l'AngIII par voie i.c.v. chez le rat anesthésié normotendu (rat Wistar Kyoto : WKY) ou hypertendu (rat spontanément hypertendu : SHR) en absence ou en présence d'inhibiteurs spécifiques de l'APA (EC33) ou de l'APN (PC18), la pression artérielle (PA) ainsi que la fréquence cardiaque ont été enregistrées après cathétérisme de l'artère fémorale. Chez les rats WKY aussi bien que chez les rats SHR, le prétraitement par l'inhibiteur d'APA (EC33 : 100 µg) bloque l'augmentation de PA induite par 10 ng d'AngII. De plus, injecté seul, cet inhibiteur a un effet hypotenseur, dose dépendant, plus marqué chez le rat SHR. A l'inverse, l'inhibiteur d'APN (PC18 de 10 à 100 µg) injecté seul augmente la PA de façon dose dépendante et cet effet est antagonisé par un antagoniste des récepteurs AT1. Ces résultats démontrent que, dans le système nerveux central, l'AngII doit être convertie en AngIII pour induire une augmentation de PA. Cette étude suggère fortement que l'AngIII serait l'effecteur du SRA dans le contrôle central de la PA, via les récepteurs AT1.

En conclusion, ces études font apparaître que, contrairement à la périphérie où l'AngII jouerait un rôle prépondérant au sein du SRA, l'AngIII serait au niveau cérébral, l'un des principaux effecteurs du contrôle de la sécrétion de vasopressine et du maintien de la pression artérielle.

*C. Potentialisation par l'AMP cyclique de la réponse calcique induite par l'AngII et l'AngIII dans la branche large ascendante corticale de rein de rat (CTAL)*

Nous avons récemment montré que le CTAL exprime majoritairement les messagers du récepteur  $AT_{1A}$ . Dans ce même segment, les réponses calciques induites par l'AngII et l'AngIII sont médiées par ce même sous-type de récepteur :  $AT_{1A}$ . D'autre part, le CTAL possède une activité adénylcyclasique stimulée par différentes hormones, telle que l'arginine vasopressine (AVP). Les voies de l'adénylcyclase (AC) et de la phospholipase C (PLC) étant liées, l'objectif de notre travail était donc d'analyser les interactions entre l'AMP cyclique et les réponses calciques induites par l'AngII et l'AngIII. Pour mener à bien cette étude nous avons prétraité les CTAL soit avec de la forskoline (Fsk), soit avec de l'AVP dans le but de stimuler la voie de l'AMP cyclique. Les mesures de libération de calcium intracellulaire  $[Ca^{2+}]_i$  sont réalisées par microfluorimétrie, avec la sonde fura-2.

Les résultats obtenus sont les suivants : après 10 minutes de préincubation en présence de 5  $\mu$ M de Fsk, une augmentation significative de la réponse calcique induite par 100 nM d'AngII dans le CTAL est observée par rapport aux contrôles [ $383 \pm 42$  nM ( $n = 7$ ) vs  $270 \pm 21$  nM ( $n = 7$ ),  $p < 0,05$ ]. Une potentialisation du même ordre est retrouvée avec 100 nM d'AngIII et de moindre amplitude en présence d'une dose plus faible d'AngIII (10 nM). Lorsque les CTAL sont prétraités 10 minutes avec 0,1  $\mu$ M d'AVP, on obtient également une potentialisation de la réponse calcique induite par 100 nM d'AngIII [ $333 \pm 23$  ( $n = 9$ ) vs contrôles :  $210 \pm 14$  ( $n = 12$ ),  $p < 0,001$ ]. Le rôle de la protéine kinase A (PKA) dans ce phénomène a été recherché en utilisant le H-89, un inhibiteur puissant de cette enzyme. Clairement, les résultats indiquent que lorsque 10  $\mu$ M de H-89 sont préincubées avec de la Fsk, la potentialisation de la réponse induite par 100 nM d'AngIII est abolie. En absence de calcium dans le milieu externe, la potentialisation induite par 10 nM d'AngIII en présence de Fsk persiste, suggérant que cette augmentation de la réponse calcique est dûe à une augmentation de l'activité de la PLC.

En conclusion, ces résultats montrent la présence dans le CTAL d'une interaction postive entre l'AC et la PLC via la PKA conduisant à une potentialisation des réponses calciques induites par l'AngII et l'AngIII.

*D. Récepteurs de l'AngII/AngIII de type 1 ( $AT_{1a}$  et  $AT_{1b}$ ) et 2 ( $AT_2$ )*

Les fonctions des angiotensines au niveau du système nerveux central sont nombreuses mais les mécanismes d'action précis des angiotensines à ce niveau sont encore mal compris. De plus, la mise au point par l'industrie pharmaceutique de molécules bloquant les récepteurs des angiotensines nécessite que soit aussi évalué en détail l'effet des angiotensines sur le système nerveux central (en plus

des cibles déjà bien identifiées : vaisseaux et surrénales). Notre projet constitue une première approche d'une étude fine du mode d'action des angiotensines au niveau central, via leurs récepteurs. Ces études permettraient non seulement de localiser le messager de ces récepteurs dans les différentes structures cérébrales mais aussi au niveau cellulaire afin d'associer à chaque sous-type de récepteur une fonction biologique. De plus, la mise en évidence de leur régulation nous permettra de mieux comprendre la modulation de ces fonctions au cours de différentes conditions physiopathologiques.

### 1 — Distribution du récepteur $AT_2$ dans le SNC

Une cartographie complète du messager du récepteur  $AT_2$  dans le cerveau de rat adulte a été réalisée par hybridation *in situ* en utilisant une ribsonde spécifique de ce récepteur. Le messager du récepteur  $AT_2$  est présent dans les noyaux impliqués dans le système limbique : le noyau du septum latéral, le cortex entorhinal et quelques noyaux de l'amygdale. Par ailleurs, on retrouve une expression importante de l'ARNm du récepteur  $AT_2$  dans plusieurs noyaux thalamiques ainsi que dans les noyaux du lit de la decussation supraoptique, subthalamique, rouge, tegmental pediculo-pontine, paragenouillé, dans le complexe de l'olive inférieure, le noyau moteur de l'hypoglosse et dans de nombreux noyaux du tronc cérébral et du cervelet. Un marquage modéré seulement est retrouvé dans le locus coeruleus. Il est à noter qu'il y a très peu de structures exprimant à la fois les récepteurs  $AT_1$  et  $AT_2$ . La localisation cellulaire neuronale de l'ARNm du récepteur  $AT_2$  a été démontrée dans certaines régions cérébrales, et ce par étude de double marquage utilisant l'hybridation *in situ* couplée à une détection immunohistochimique d'un marqueur astrocytaire, la GFAP.

La distribution centrale du récepteur  $AT_2$  suggère qu'il pourrait être impliqué dans des fonctions motrices et sensorielles de même que dans la régulation de la prise de boisson. En effet, le noyau du septum latéral et les noyaux de l'amygdale central et médian jouent un rôle dans la prise de boisson et l'appétit pour le sel. Par ailleurs, il a été récemment publié que les souris déficientes en récepteurs  $AT_2$  démontrent une sensibilité exagérée à l'effet hypertenseur de l'angiotensine II, ont un comportement exploratoire atténué, une température corporelle diminuée et une prise d'eau anormale en réponse à la restriction hydrique. Cependant le rôle exact des récepteurs de type  $AT_2$  dans le contrôle central de ces fonctions reste à préciser. Une première approche consistera à identifier la population neuronale exprimant ces récepteurs.

### 2 — Ontogenèse des récepteurs de type $AT_{1a}$ , $AT_{1b}$ et $AT_2$ au cours du développement du cerveau de rat

Une cartographie cérébrale complète des messagers des récepteurs  $AT_{1a}$ ,  $AT_{1b}$  et  $AT_2$  au cours du développement fœtal et néonatal du rat (du jour 11 de gestation (E11) au terme (21 jours ou E21), et jusqu'à 28 jours d'âge postnatal)

a été réalisée dans notre équipe à l'aide de ribosondes spécifiques. L'expression du récepteur  $AT_2$  apparaît à E13 et celle du récepteur  $AT_{1a}$  à E15. L'analyse plus détaillée des résultats montre une expression prédominante du récepteur  $AT_2$  au cours du développement cérébral fœtal : à partir du stade E15, on retrouve un marquage particulièrement prononcé dans le noyau hypoglosse, de même que dès E17 dans l'olive inférieure, le thalamus et les noyaux subthalamique, rouge et tegmental pediculo-pontine. Il est à noter que l'intensité du marquage au niveau du noyau hypoglosse et de l'olive inférieure diminue de façon notable en postnatal mais persiste jusqu'à maturité. Le corps genouillé médian exprime le récepteur  $AT_2$  à partir du premier jour de vie.

Chez l'adulte, le récepteur  $AT_{1a}$  est retrouvé surtout dans des noyaux impliqués dans le contrôle cardiovasculaire, l'homéostasie hydro-sodée et la régulation neuroendocrinienne (structures circum- et péri-ventriculaires, hypothalamiques et certains noyaux du bulbe rachidien inférieur). Des études récentes chez le mouton fœtal et nouveau-né ont souligné l'importance du système rénine-angiotensine dans le contrôle et l'adaptation cardio-vasculaire périnatale. En effet, l'inhibition de l'ACE déplace le baroréflexe artériel vers de plus basses pressions chez le nouveau-né mais pas chez le fœtus et prévient la maturation postnatale du baroréflexe. Ces observations sont reproduites par l'administration d'un antagoniste du récepteur  $AT_1$  (les sous-types  $AT_{1a}$  et  $AT_{1b}$  n'ont été identifiés que chez les murins). Les angiotensines modulent le baroréflexe artériel chez l'adulte au niveau de la médulla (principalement le noyau du tractus solitaire). L'ARNm du récepteur  $AT_{1a}$  est exprimé faiblement dans la médulla ventro-latérale dès E17 et n'est clairement exprimé dans le noyau du tractus solitaire et l'area postrema qu'à partir de E21. Un marquage est retrouvé dans les structures circumventriculaires organe vasculaire de la lame terminale et organe subformical, dans le noyau médian preoptique et dans les noyaux para- et periventriculaires à partir de E19. Par ailleurs le cortex piriforme, exprimant fortement le récepteur  $AT_{1a}$  chez l'adulte, n'est marqué qu'à partir de E21.

Toutes les structures exprimant des récepteurs  $AT_{1a}$  ou  $AT_2$  chez l'adulte sont marquées à 7 jours de vie, et les intensités relatives d'expression à 28 jours sont identiques à celles retrouvées chez l'adulte. Le sous-type  $AT_{1b}$  n'est pas exprimé dans le cerveau de rat en développement, ainsi que nous l'avions montré chez l'adulte, il est uniquement retrouvé dans l'antéhypophyse.

#### 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, S. MISEREY, B. TEUTSCH,  
B. VIANELLO

L'activité du groupe au cours de l'année 1996-97 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).

### A. Récepteurs de l'angiotensine II

Les récepteurs de l'AngII ( $AT_1$  humain,  $AT_{1A}$ , et  $AT_{1B}$  de rat,  $AT_2$  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 précisé la pharmacologie et la signalisation intracellulaire de ces récepteurs. Le mécanisme de transmission de l'effet mitogène de l'AngII par le récepteur  $AT_{1A}$  a été approfondi dans les cellules CHO et fait intervenir une mécanisme PKC-dépendant plus qu'une activation des phosphorylations sur tyrosines des protéines totales ou de certaines protéines spécifiques (Jak2, STAT1, SHC, FAK et  $p60^{src}$ ).

— La pharmacologie moléculaire d'un composé non peptidique agoniste des récepteurs  $AT_1$  (L162 313) a été étudiée. Ce composé se fixe avec la même faible affinité (200 nM) aux récepteurs  $AT_{1A}$ ,  $AT_{1B}$  et  $AT_2$  et se comporte comme un agoniste partiel et un antagoniste partiel vis à vis du récepteur  $AT_1$ . De plus sa liaison à une batterie de mutants du récepteur  $AT_{1A}$  indique que son site de liaison au récepteur est en partie au moins superposable à celui du Losartan.

— 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, leur internalisation et leur désensibilisation 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.

— La spécificité de couplage aux protéines G et les déterminants moléculaires responsables de l'activation constitutive des récepteurs de l'AngII ont été analysés en remplaçant le segment distal de la 3<sup>e</sup> boucle intracellulaire du récepteur  $AT_1$  par les séquences correspondantes des récepteurs  $\alpha 1$  et  $\beta 2$ -adrénergiques et le



récepteur  $AT_2$ . Ces modifications n'entraînent pas d'activation constitutive du récepteur  $AT_1$ , mais modifient son couplage aux protéines G : conservation du couplage avec Gq pour la chimère  $\alpha 1$ -adrénergique, suppression du couplage pour la chimère  $AT_2$  et réduction du couplage Gq et apparition d'un couplage Gs associées à la suppression de la transmission du message mitogène de l'AngII pour la chimère  $\beta 2$ -adrénergique.

— Enfin nous avons développé plusieurs modèles d'étiquetage du récepteur  $AT_{1A}$  de rat en l'absence d'anticorps spécifiques contre cette protéine. La réalisation d'une protéine de fusion récepteur  $AT_{1A}$ -EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein) permet l'expression d'un récepteur fonctionnel, facilement identifiable par Western blot, immunoprécipitation et histochimie, dont les interactions avec différentes protéines G et d'autres protéines de signalisation ainsi qu'avec les protéines kinases impliquées dans la désensibilisation homologue et hétérologue sont en cours d'étude.

### 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 du 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. Le clonage et l'expression de l'ADNc et du gène du récepteur V3 de souris sont en cours, afin d'effectuer l'inactivation de ce gène par recombinaison homologue.

### 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., soumis).

— Enfin, et dans le cadre d'une collaboration avec A.F. BURNOL (CRI CNRS, Laboratoire de J. GIRARD à Meudon), nous avons étudié le rôle fonctionnel d'une protéine appelée A20 et appartenant à la famille des protéines Grb, clonée par la méthode du double hybride avec une sonde correspondant au domaine tyrosine kinase activé du récepteur de l'insuline. Cette protéine interagit spécifiquement avec le récepteur phosphorylé et est elle-même phosphorylée par le récepteur de l'insuline. La fonction d'A20 est d'inhiber la transmission des effets mitogéniques de l'insuline.

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

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

### A. *Génétique moléculaire de l'angiotensinogène*

Le but de ce projet est l'étude des conséquences fonctionnelles des variants moléculaires du gène de l'angiotensinogène identifiés chez l'homme et leur association avec différentes formes d'hypertension artérielle. Il concerne également l'étude du rôle de la glycosylation de la protéine et à plus long terme, de sa caractérisation structurale. Ce dernier aspect concerne la production en masse de l'angiotensinogène et la mise au point de sa purification en vue de réaliser sa cristallisation.

#### 1 — *Conséquences fonctionnelles de variants naturels*

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 à 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. Ce travail est effectué en collaboration avec le laboratoire de génétique humaine de J.M. Lalouel (Utah, USA).

Nous avons également participé à une large étude de cohorte allemande étudiant 636 sujets caucasiens qui confirme que l'allèle 235T est associé à une élévation de la PA et du taux plasmatique d'AGT mais aussi à une augmentation de la prescription du nombre de médicaments antihypertenseurs.

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.

## 2 — Étude structurale

Quatre axes ont été donnés au projet : 1) étude de la glycosylation par mutagenèse dirigée de chacun des sites de N-glycosylation et expression des protéines recombinantes, 2) localisation et caractérisation du ou des ponts disulfures, 3) étude de l'angiotensinogène de haut poids moléculaire (AGT HMW), 4) production en masse et purification de la protéine à large échelle.

1. *L'AGT humain comporte quatre sites consensus potentiels de N-glycosylation.* Les asparagines des sites consensus de glycosylation ont été substituées par des glutamines dans de multiples combinaisons (simples mutants 14Q ou 137Q ou 271Q ou 295Q, doubles mutants 14Q/137Q ou 271Q/295Q, triples mutants 14Q/137Q/271Q ou 137Q/271Q/295Q) pour finalement obtenir une protéine totalement N-déglycosylée appelée AGT N<sup>-</sup>. Une lignée stable en cellules CHO a été établie pour chacun des simples mutants et pour AGT N<sup>-</sup>. Chacun des sites potentiels de N-glycosylation apparaît effectivement glycosylé (environ 2 kDa du poids moléculaire total de la protéine). La protéine déglycosylée se présente sous la forme d'une bande unique homogène sur gel de SDS-PAGE (western blot et marquage métabolique) de 50 kDa. En fonction de ces résultats, nous pouvons estimer que la N-glycosylation de l'AGT est responsable de 10 % environ du poids moléculaire total de la protéine. La O-déglycosylation (estimée sur SDS-PAGE après l'action enzymatique de la neuraminidase et de la O-glycosidase) de la protéine totalement N-déglycosylée est négligeable. La biosynthèse cellulaire (en cellules COS et CHO) est affectée pour la protéine complètement déglycosylée qui, bien que sécrétée dans le milieu de culture dès la 10<sup>e</sup> minute de chasse, présente des anomalies du routage intracellulaire avec rétention intracellulaire persistant après la 48<sup>e</sup> heure de chasse. La production des différentes protéines recombinantes est en cours afin de pouvoir réaliser prochainement des expériences de cinétique enzymatique pour déterminer si les différents degrés de glycosylation de l'AGT modifient les constantes de cinétique de la réaction enzyme-substrat.

2. *L'AGT humain comprend quatre cystéines* (position 18, 138, 232, 308). Seules les cystéines en position 18 et 138 sont conservées à une même position entre différentes espèces et pourraient être impliquées dans un pont disulfure. Les

quatre cystéines de l'AGT ont été remplacées par mutagénèse dirigée par des alanines pour obtenir les simples mutants : 18A, 138A, 232A, 308A. Leur étude est en cours, afin de faciliter la localisation des pont(s) disulfure(s) éventuel(s).

3. *Pendant la grossesse, une forme d'AGT « de haut poids moléculaire » (HMW) apparaît*, dont le rôle physiologique est inconnu. Sa structure a été récemment élucidée et correspond à un hétérotétramère associant : 1) deux molécules d'AGT et deux molécules de pro-MBP (protéine basique majeure des éosinophiles) pour donner un complexe de 200 kDa environ, 2) deux molécules de la fraction C3dg du complément qui se rajoutent au complexe précédent pour donner une forme de 300 kDa environ. Ces complexes se formeraient par l'intermédiaire de liaisons covalentes impliquant des cystéines libres de l'AGT (4). En collaboration avec l'équipe de Sottrup-Jensen au Danemark qui a établi la composition de l'AGT HMW, nous étudions actuellement les conséquences éventuelles des polymorphismes de l'AGT sur la formation de cet agrégat. En particulier, nous souhaitons déterminer : 1) si l'AGT HMW peut être synthétisé *in vitro* (expériences de co-transfection des cDNA d'AGT sauvage et de MBP en cellules COS), 2) si la formation du complexe multimérique se fait bien, suivant notre hypothèse, par l'intermédiaire de la cystéine 232, 3) si l'acide aminé en position 235 (méthionine ou thréonine) est important pour cet assemblage.

4. *Un travail important de mise au point de la purification de l'AGT* a été effectué au cours de l'année 1996. Après une tentative d'immunopurification en une étape qui avait le désavantage de dénaturer au moins partiellement la protéine, une stratégie plus conventionnelle a été mise au point sur FPLC par passage successif sur 3 colonnes d'affinité (phényl-sépharose, Concanavalin-A, Mono-Q). Sur des échelles de l'ordre de 100 µg, des résultats très prometteurs ont été obtenus avec un degré de pureté de la protéine de plus de 90 % et un rendement de l'ordre de 10 %. La qualité de cette purification devrait nous permettre d'analyser les protéines recombinantes sauvage et partiellement ou totalement déglycosylée et constitue un préalable à la cristallisation de la protéine, franchi avec succès. Ce projet est effectué en collaboration avec les laboratoires Hoffmann-Laroche.

#### *B. Implications du canal Na<sup>+</sup> épithélial amiloride-sensible dans l'HTA essentielle*

La présence de mutations sévères des sous-unités β et γ 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 nous a permis d'identifier cinq mutations faux-sens sur la sous-unité β et quatre mutations faux-sens sur la

sous-unité  $\gamma$ . Leur fréquence est rare dans la population hypertendue caucasienne mais plus fréquente parmi les sujets d'origine africaine. Grâce à 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 en patch-clamp, nous n'avons pu montrer qu'une élévation très modeste du courant  $\text{Na}^+$  sensible à l'amiloride pour chacune des mutations étudiées.

### C. *Maladie de Liddle*

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. Dans cette pathologie, nous avons initié une collaboration avec le groupe de GA MacGregor à Londres, afin d'évaluer la possibilité de mesurer l'effet d'une mutation du canal Na épithélial au niveau de l'épithélium nasal. Les premiers résultats sont très encourageants, montrant une augmentation nette de la différence de potentiel mesurable à ce niveau.

### D. *Études des relations entre phénotypes-génotypes dans l'HTA essentielle*

Cette étude a pour objectif l'étude de la liaison, par la méthode des germains affectés, entre des gènes candidats et des phénotypes intermédiaires impliqués dans la régulation de la pression artérielle. Elle s'effectue à Paris (Hôpital Broussais) en collaboration avec 2 centres aux États-Unis (Boston dans le Massachusetts, Salt Lake City dans l'Utah) dans le but d'analyser 100 paires de frères ou sœurs hypertendus selon le même protocole (25 paires analysées / centre / an). L'ensemble de cette collaboration a reçu l'approbation des autorités administratives américaines et fait l'objet d'un support financier du Ministère de la Santé américain (Grant application R01 HL 47651-01, « Genetics of Human Hypertension »).

Une analyse phénotypique très précise est effectuée avec en particulier l'étude des variations du taux plasmatique de la rénine et des différents éléments du système rénine angiotensine après stimulation par : 1) la mise en position debout, 2) la prise aiguë d'inhibiteur de l'enzyme de conversion (captopril), 3) un régime sans sel strict de 4 jours, 4) une perfusion d'angiotensine II. L'analyse de ces paramètres chez des frères/sœurs devrait permettre de relier les marqueurs génétiques aux variations quantitatives observées. D'autres prélèvements (sang, plasmatiques et urinaires) sont effectués pour l'analyse d'autres phénotypes intermédiaires (CT-NaLi, kallicréine urinaire, par ex.). Les premiers résultats obtenus sur 97 paires de germains montrent des résultats originaux de ressemblance familiale du niveau de rénine plasmatique, de sensibilité de l'excrétion urinaire de cortisol libre urinaire sous régime désodé. Ces analyses seront complé-

tées par le génotypage de marqueurs hautement polymorphes sur les gènes candidats concernés.

Des résultats intéressants ont été également obtenus sur le système kalicréine-kinine, avec en particulier la découverte de polymorphismes au niveau de l'exon 3 du gène de la kalicréine rénale qui semblent associés à l'excrétion urinaire de kalicréine.

#### *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). Plusieurs localisations suggérées par un screening systématique très dense sont en cours de confirmation.

#### *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-ségrégant avec l'hypertension a été particulièrement étudiée.

Une étude récente a été menée pour 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 sont 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-oxydasiq ue 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, différentes des formes déjà décrites qui résultent d'un gène surnuméraire chimérique, et puissent ainsi contribuer à l'hypertension artérielle dite essentielle.

## BIBLIOGRAPHIE

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 I 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 JEUNEMAITRE 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 V<sub>3</sub> 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 V<sub>3</sub> 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.

LAGRIFFOUL A., CHARPENTIER N., CARRETTE J., TOUGARD C., BOCKAERT J. and HOMBURGER V. Secretion of protease nexin-1 by C6 glioma cells is under the control of a heterotrimeric G protein, G<sub>o1</sub>. *J. Biol. Chem.* 271 : 31508-31516, 1996.

KONOSHITA T., GERMAIN S., PHILIPPE J., CORVOL P. and PINET F. Evidence that renal and chorionic tissues contain similar nuclear binding proteins that recognize the human renin promoter. *Kidney Int.* 50 : 1515-1525, 1996.

WILLIAMS T.A., MICHAUD A., HOUARD X., CHAUVET M.-T. and CORVOL P. *Drosophila melanogaster* angiotensin I-converting enzyme expressed in *Pichia pastoris* resembles the C domain of the mammalian homologue and does not require



glycosylation for secretion and enzymic activity. *Biochem. J.* 318 : 125-131, 1996.

SCHÜTZ S., LE MOULLEC J.-M., CORVOL P. and GASC J.-M. Early expression of all the component of the renin-angiotensin system in human development. *Am. J. Pathol.* 149 : 2067-2079, 1996.

KEMPF H., LE MOULLEC J.-M., CORVOL P. and GASC J.-M. Molecular cloning, expression and tissue distribution of a chicken angiotensin II receptor. *FEBS Lett.* 399 : 198-202, 1996.

COHEN P., BADOUILLE G., GIMENEZ-ROQUEPLO A.-P., MANI J.-P., GUYENE T.-T., JEUNEMAITRE X., MENARD J., CORVOL P., PAU B. and SIMON D. Selective recognition of M235T angiotensinogen variants and their determination in human plasma by monoclonal antibody-based immunoanalysis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 81 : 3505-3512, 1996.

SECCHI L.A., GRIFFIN C.A., GIACCHETTI G., VALENTIN J.-P., LLORENS-CORTES C., CORVOL P. and SCHAMBELAN M. Tissue-specific regulation of type 1 angiotensin II receptor mRNA levels in the rat. *Hypertension* 28 : 403-408, 1996.

ZINI S., FOURNIE-ZALUSKI M.-C., CHAUVEL E., ROQUES B.P., CORVOL P. and LLORENS-CORTES C. Identification of metabolic pathways of brain angiotensin II and III using specific aminopeptidase inhibitors : Predominant role of angiotensin III in the control of vasopressin release. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93 : 11968-11973, 1996.

SHANMUGAN S., CORVOL P. and GASC J.-M. Angiotensin II type 2 receptor mRNA expression in the developing cardiopulmonary system of the rat. *Hypertension* 28 : 91-97, 1996.

LENKEI Z., PALKOVITS M., CORVOL P. and LLORENS-CORTES C. Distribution of angiotensin II type-2 receptor (AT<sub>2</sub>) mRNA expression in the adult rat brain. *J. Comp. Neurol.* 373 : 322-339, 1996.

WILLIAMS T., DANILOV S., ALHENC-GELAS F. and SOUBRIER F. A study of chimeras constructed with the two domains of angiotensin I-converting enzyme. *Biochem. Pharmacol.* 51 : 11-14, 1996.

CORVOL P., SOUBRIER F. and JEUNEMAITRE X. Molecular genetics of the renin-angiotensin-aldosterone system in human hypertension. *In* : Genetic Approaches to Noncommunicable Diseases, K. Berg, V. Boulyjenkov, Y. Christen (eds), Springer-Verlag-Berlin-Heidelber, pp. 47-63, 1996.

WEN Y., NADLER J.L., GONZALES N., SCOTT S., CLAUSER E. and NATARAJAN R. Mechanisms of angiotensin II type 1 induced mitogenic responses : key role of 12-lipoxygenase and biphasic mitogen activated protein kinase. *Am. J. Physiol.* 40 : C1212-C1220, 1996.

DANILOV S., SAVOIE F., LENOIR B., JEUNEMAITRE X., AZIZI M. and ALHENC-GELAS F. Two variants of enzyme immunoassays for human plasma angiotensin-

converting enzyme suitable for large-scale and genetic studies. *J. Hypertens.* 14 : 719-727, 1996.

WILLIAMS G.H., HOLLENBERG N.K., HOPKINS P.M. and JEUNEMAITRE X. The role of intermediate phenotypes in essential hypertension : non-modulation as a model. *Endocrinol. Res.* 22 : 675-680, 1996.

## 1997

MULLER L., BARRET A., PICART R. and TOUGARD C. Proteolytic processing of sulfated secretogranin II in the *trans*-Golgi network of GH6B6 cells. *J. Biol. Chem.* 272 : 3669-3673, 1997.

WILLIAMS T.A., GOUTTAYA M., TOUGARD C., MICHAUD A., CHAUVET M-T. and CORVOL P. Cleavage-secretion of angiotensin I-converting enzyme in yeast. *Mol. Cell. Endocrinol.* 128 : 39-45, 1997.

AUZAN C., DEBANT A., ROSSI B. and CLAUSER E. Cleavage site mutants of the subtype B insulin receptor are uncleaved and fully functional. *Mol. Cell. Endocrinol.* 128 : 129-137, 1997.

LE MOULLEC J.-M., JOUQUEY S., CORVOL P. and PINET F. A sensitive RT/PCR assay for measuring the effects of dehydration and gestation in rat AVP and OT mRNAs. *Mol. Cell. Endocrinol.* 128 : 151-159, 1997.

JEUNEMAITRE X., LEDRU F., BATTAGLIA S., GUILLANNEUF M-T., COURBON D., DUMONT C., DARMON O., GUIZE L., GUERMONPREZ J.-L., DIEBOLD B. and DUCIMETIERE P. Genetic polymorphisms of the renin-angiotensin system and angiographic extent and severity of coronary artery disease : the CORGENE study. *Hum. Genet.* 99 : 66-73, 1997.

CURNOW K.M., MULATERO P., EMERIC-BLANCHOUIN N., AUPETIT-FAISANT B., CORVOL P. and PASCOE L. The amino acid substitution Ser288Gly and Val320Ala convert the cortisol producing enzyme, CYP11B1, into an aldosterone producing enzyme. *Nat. Struct. Biol.* 4 : 32-35, 1997.

ZINI S., MASDEHORS P., LENKEI Z., FOURNIE-ZALUSKI M.-C., ROQUES B.P., CORVOL P. and LLORENS-CORTES C. Aminopeptidase A : Distribution in rat brain nuclei and increased activity in spontaneously hypertensive rats. *Neuroscience* 78 : 1187-1193, 1997.

CORVOL P., SOUBRIER F. and JEUNEMAITRE X. Molecular genetics of the renin-angiotensin-aldosterone system in human hypertension. *Path. Biol.* 45 : 229-239, 1997.

GERMAIN S., PHILIPPE J., FUCHS S., LENGRONNE A., CORVOL P. and PINET F. Regulation of human renin secretion and gene transcription in Calu-6 cells. *FEBS Lett.* 407 : 177-183, 1997.

DAVIES E., BONNARDEAUX A., PLOUIN P.F., CORVOL P. and CLAUSER E. The role of angiotensin II (type 1) receptor in primary hyperaldosteronism. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82 : 611-615, 1997.

SCHUNKERT H., HENSE H.W., GIMENEZ-ROQUEPLO A.-P., STIEBER J., KEIL U., RIEGGER A.G. and JEUNEMAITRE X. The angiotensinogen T235 variant as a genetic risk factor for an increased antihypertensive therapy. *Hypertension* 29 : 628-633, 1977.

RODIEN P., JEUNEMAITRE X., DUMONT C., BELDJORD C. and PLOUIN P.-F. Genetic alterations of the RET protooncogene in familial and sporadic pheochromocytomas. *Horm Res.* 47 : 263-268, 1997.

INOUE I., NAKAJIMA T., WILLIAMS C.S., QUACKENBUSH J., PURYEAR R., POWERS M., CHENG T., LUDWIG E., SHARMA A., HATA A., JEUNEMAITRE X. and LALOUEL J.M. A nucleotide substitution in the promoter of human angiotensinogen is associated with essential hypertension and affects basal transcription in vitro. *J. Clin. Invest.* 99 : 1786-1797, 1997.

MARRE M., JEUNEMAITRE X., GALLOIS Y., RODIER M., CHATELLIER G., SERT C., DUSSELIER L., KAHAL Z., CHAILLOU L., HALIMI S., MULLER A., SACKMANN H., BAUDUCEAU B., BLED F., PASSA P. and ALHENC-GELAS F., on behalf of the GENEDIAB group. Contribution of genetic polymorphisms of the renin angiotensin system to the development of renal complications in insulin-dependent diabetes. *J. Clin. Invest.* 99 : 1585-1595, 1997.

#### EXPOSÉS, CONGRÈS

**Monsieur Pierre Corvol** a séjourné trois mois à la Harvard School of Public Health (Harvard, Boston) comme Visiting Professor. Il a été le Chairman de l'European Research Conference on Hypertension and Cardiovascular Disease à Amsterdam en 1996 et le Chairman de la Gordon Research Conference sur l'Angiotensine en avril 1997.

**Monsieur Jean-Marie Gasc** a participé à la « Neurologische Klinik der Charité » à Berlin, Allemagne (Invitation Pr Martin Paul) le 28 octobre 1996.

**Monsieur Hervé Kempf** a participé à la Gordon Conference sur l'angiotensine du 20 au 25 avril 1997 à Il Ciocco (Italie).

**Mademoiselle Florence Pinet** et son équipe ont participé aux congrès suivants : Conference Jacques Monod « 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) ; II Franco-Australian Meeting on Hypertension (8-11 septembre 1996) ; European Research Conference on Blood Pressure and Cardiovascular Disease (19-21 octobre 1996) ; Gordon Conference on angiotensin (20-25 avril 97) ; Congrès Biologie et Pathologie du cœur et des vaisseaux (29-30 avril 97).

**Madame Claude Tougard** a participé aux congrès suivants : XXV<sup>e</sup> Colloque de la Société de Neuroendocrinologie Expérimentale, Strasbourg, 27-28 septembre 1996, à la Journée Jacques Benoit, Obernai, 29 septembre 1996 et au Congrès

Européen de Biologie Cellulaire et Moléculaire, Brighton, 22-25 mars 1997. Elle a donné un séminaire à l'U.F.R. Biomédicale des Saints-Pères, Paris (Prof. J.P. Dadoune).

**Madame Évelyne Vila-Porcile** a participé au Congrès Européen de Biologie Cellulaire et Moléculaire, Brighton, 22-25 mars 1997.

**Madame Catherine Llorens-Cortes** et son équipe ont participé aux congrès suivants : European Kidney Research Forum (EKRF), Bergamo, Baveno (Italy), 24-27 mai 1996 ; 18th Conference of european comparative endocrinologists, Palais des congrès — Rouen — France — 10-14 septembre 1996 (conférencier) ; The 2nd meeting of European Neuroscience, Palais de la musique et des Congrès, Strasbourg, (France), 24-28 septembre 1996 ; The American Society of Nephrology (ASN), 29th annual meeting, New Orleans, Louisiana (USA), 3-6 novembre 1996 ; Neural Mechanisms in Hypertension, Satellite Symposium to the 16th Scientific Meeting of the International Society of Hypertension, Strasbourg, (France), 21 juin 1996 ; The 2nd meeting of European Neuroscience, Palais de la musique et des Congrès, Strasbourg, (France), 24-28 septembre 1996. Conjointement avec le XXV<sup>e</sup> Colloque de la Société de Neuroendocrinologie Expérimentale, 26-28 septembre 1996 ; The American Pediatric Society / The Society for Pediatric Research — Washington (USA) — 1-4 mai 1997 ; Gordon Research Conference on Angiotensin — Il Ciocco — Italy — 20-25 avril 1997 (conférencier).

**Monsieur Éric Clauser** et son équipe ont participé aux congrès suivants : 10th International congress of Endocrinology — June 1996 — San Francisco — USA ; « Insulin receptor and insulin actions » symposium. Copenhagen — DK — May 1996 ; 25th colloque de la société de neuroendocrinologie expérimentale. Strasbourg, 27 et 28 septembre 1996 ; Colloque INSERM « Protéines tyrosine kinases et transduction du signal » 19 mars 1997 — Paris ; ALFEDIAM — Amiens 19-23 mars 1997.

**Monieur Xavier Jeunemaitre** et son équipe ont participé aux congrès suivants : Winter Gordon Conference on Angiotensin. Ventura, California, February 18-23, 1996 ; 39<sup>e</sup> Journées Internationales HP Klotz d'Endocrinologie Clinique, Paris, mai 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 ; Réunion Interface SFE/INSERM, XIV<sup>e</sup> Congrès de la Société Française d'Endocrinologie, Angers, 5 septembre 1996 ; IInd Franco-Australian Meeting on Hypertension, Broome, Australia, September 8-11, 1996 ; European Research Conference on Blood Pressure and Cardiovascular Disease, Noordwijkkerhout, October 19-21, 1996 ; I.A.E.S. Workshop, CORATA, Strasbourg, 29 octobre 1996 ; Journées de la Société Française d'HTA, Paris, décembre 1996 ; Meeting of the European Society of Human Genetics, Genova Italy, May 1997.

## 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 1996 ; DEA de « Biologie Cellulaire et Moléculaire » (Cours et encadrement du séminaire d'un étudiant), Paris VI, février 1997 ; DEA d'« Endocrinologie et Interactions Cellulaires » (séminaire méthodologique et encadrement de séminaires d'étudiants), Paris XI, juin 1997.

**Madame Catherine Llorens-Cortes** a participé à l'enseignement : i) Pharmacologie Endocrinienne (Paris VII) : C2 pour la Maîtrise des Sciences Biologiques et Médicales et Diplôme d'Université ; ii) du DEA de pharmacologie cardiovasculaire (Institut de recherches internationales SERVIER), Orléans ; iii) du DEA de Pharmacologie Moléculaire (B. Roques). Elle a donné les séminaires suivants : *En France* : avril 1996, Biochimie Cellulaire — Collège de France (De Netter) Paris ; mai 1996, CEA, Service de Biologie Cellulaire (A. Doucet) Saclay ; décembre 1996, INSERM U64 (R. Ardaillou) Paris. *A l'étranger* : avril 1996, Semmelweis University Medical School, Neuromorphology (M. Palkovits) Budapest — Hongrie ; décembre 1996 ; Institut für Pharmakologie, Klinikum der Christian Albrechts (T. Unger) Kiel — Allemagne.

**Monsieur Éric Clauser** a participé aux enseignements suivants : Cours de Biochimie de 1<sup>re</sup> (Biochimie métabolique et énergétique) et 2<sup>e</sup> 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. Participation à l'enseignement de Génétique 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.

## DISTINCTION SCIENTIFIQUE

1996. Prix SNE-Servier accordé à Zsolt Lenkei pour son travail de thèse effectué sous la direction de C. Llorens-Cortes sur les récepteurs angiotensinergiques de type 1 et de type 2 dans le SNC de rat.

## LISTE DES DIPLÔMÉS

*DEA*

Xavier Itturrioz : DEA de Biologie Cellulaire et Moléculaire (Paris VI). *Étude structure-fonction de l'aminopeptidase A par mutagenèse dirigée et expression dans les cellules eucaryotes.*

Myriam Gouttaya : DEA de Pharmacochimie Moléculaire, Pharmacologie Expérimentale et Métabolisme (Paris V). *Mise en évidence de la solubilisation de l'enzyme de conversion de l'angiotensine I dans la levure Pichia Pastoris.*

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

*Thèse*

Xavier Jeunemaitre — Thèse de Doctorat en Génétique Humaine. Université 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.*

Sophie Conchon — Thèse de Doctorat de l'Université Paris VI — Spécialité : Biologie Cellulaire et Moléculaire — Soutenue le 13 décembre 1996. *Activation, désensibilisation et internalisation des récepteurs de type 1 de l'angiotensine II.*