

## Médecine expérimentale

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

Le modelage et le remodelage de la paroi vasculaire était le sujet du cours de la Chaire de Médecine Expérimentale en 1997-1998. L'enseignement a porté essentiellement sur le développement du système vasculaire au cours de l'embryogénèse en mettant un accent particulier sur la réexpression de certains patrons fœtaux lors de situations pathologiques telles que l'angiogénèse tumorale. Le développement d'un plexus capillaire primitif, la vasculogénèse, se fait à partir des angioblastes. Les angioblastes, les premières cellules vasculaires, se différencient et migrent à partir de cellules mésodermiques pour former les tubes capillaires primitifs. L'existence d'hémangioblastes, cellules possédant une double polarité, de cellules hémopoïétiques souches et de cellules vasculaires primitives, est encore débattue. La vascularisation primitive d'organes issus de tissus endodermiques tels que le poumon, le pancréas, le cœur, l'aorte dorsale, est le fait de la vasculogénèse. L'angiogénèse intervient à un stade plus tardif et est responsable de la vascularisation d'organes tels que le rein et le cerveau. Le phénomène d'angiogénèse comporte plusieurs phases : les cellules endothéliales se libèrent de la membrane basale et de la matrice extracellulaire, migrent, prolifèrent, se différencient et se stabilisent (remodelage), créant ainsi de nouveaux vaisseaux par bourgeonnement à partir du vaisseau parental. Les cellules périvasculaires (péricytes au niveau des capillaires et cellules musculaires lisses au niveau des artérioles et des veinules) s'organisent pour former le vaisseau définitif. Au cours de ces quelques dernières années, la fonction de plusieurs gènes impliqués dans les phénomènes de vasculogénèse et d'angiogénèse a été élucidée. Les méthodes traditionnelles d'embryologie descriptive et les études pharmacologiques dans des systèmes simples (membrane chorioallantoïdienne de poulet, cornée avasculaire du lapin) se sont enrichies des techniques d'inactivation génique chez la souris par recombinaison homologue. Il est ainsi possible de préciser le rôle spatial et temporel d'une série de gènes impliqués dans ces processus.

Le Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) est le prototype du facteur de croissance vasculaire. Isolé à partir de milieux conditionnés de cultures de cellules,

il provoque, *in vitro*, une migration et une prolifération des cellules endothéliales. Il induit l'expression de protéases telles que la collagénase, les activateurs tissulaires du plasminogène (tPA et uPA) et la collagénase qui permettent la dégradation de la matrice extracellulaire. Cette activité est auto-limitée par l'induction par le VEGF de l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène (PAI-1). Le VEGF augmente la perméabilité capillaire et favorise la formation de structures capillaires en trois dimensions en culture cellulaire. *In vivo*, il est capable d'entraîner la formation de néovaisseaux.

Il existe plusieurs formes de VEGF, le premier étudié a été le VEGF-A codé par un gène unique. Le VEGF-A humain existe sous plusieurs formes résultant de la transcription alternative du gène et aboutissant à la formation de quatre protéines de poids moléculaire 121, 165, 189 et 206 kDa. Les formes les plus fréquemment rencontrées sont les VEGF 121, 165 et 189. Toutes contiennent une séquence signal qui permet la sécrétion de VEGF. Le VEGF 121 est une protéine acide, soluble, diffusible et qui ne se lie pas à l'héparine. Les VEGF 165 et 189 sont des molécules basiques, du fait de la transcription d'un exon codant pour des résidus lysine et arginine. Le VEGF 165 est sécrété et se lie à la surface des cellules endothéliales et à la membrane extracellulaire. Les VEGF 189 et 206 sont sequestrés dans la matrice extracellulaire dont ils sont libérés par l'héparine ou les héparinases. La libération de ce VEGF latent, potentiellement actif, se fait par clivage protéolytique post-traductionnel. Ce clivage peut être effectué par le système du plasminogène mis en jeu par le VEGF lui-même, via l'augmentation du tPA et de l'uPA. D'autres VEGF, relativement proches de la structure du VEGF-A, ont été isolés : les VEGF-B (167 et 186 kDa), C et D. Toutes ces molécules ont en commun un arrangement de huit cystéines conservées et retrouvées dans la structure d'un autre facteur de croissance des cellules vasculaires, le Platelet Derived Growth Factor (PDGF). Le Placental Growth Factor (PLGF) est, lui aussi, apparenté au VEGF et possède les cystéines communes au PDGF.

La régulation du gène du VEGF se fait par différents facteurs, au premier rang desquels l'hypoxie. Celle-ci entraîne une augmentation de la transcription du gène du VEGF via le facteur transcriptionnel HIF-1. L'augmentation de dix à quinze fois du message du VEGF en hypoxie résulte à la fois d'une augmentation de l'activité transcriptionnelle du gène et d'une augmentation de la stabilité de son mRNA. Les cytokines (EGF, TGF $\beta$ , les interleukines telles que IL-1 $\alpha$  et IL-6, PGE-2 et IGF-1) élèvent le taux de mRNA du VEGF. L'ensemble de ces facteurs peut concourir à l'élévation du VEGF telle qu'elle est observée dans des situations pathologiques : rétinopathie diabétique, artériopathie oblitérante des membres inférieurs et infarctus du myocarde. On observe une augmentation du taux du mRNA du VEGF dans les jours qui suivent l'occlusion expérimentale de l'artère coronaire chez le rat avec augmentation du taux de la protéine et des récepteurs du VEGF. Le VEGF est synthétisé et sécrété par les cellules mésenchymateuses périvasculaires et non pas par les cellules endothéliales. Il agit donc de façon paracrine sur ces dernières.

Il existe deux récepteurs du VEGF, Flt-1 et Flk-1/KDR. Il s'agit de récepteurs à tyrosine kinase dont la partie extracellulaire qui lie le VEGF comporte sept domaines de type immunoglobuline. Le récepteur Flt-1 a un  $K_D$  pour le VEGF 165 de 10 à 20 pmoles ; le récepteur Flk-1/KDR de 75 à 125 pmoles. Il existe une forme soluble du récepteur Flt-1 (sFlt-1) correspondant à la délétion du septième domaine de type immunoglobuline de la région transmembranaire et de la région cytosolique. Ce récepteur soluble est capable de lier le VEGF avec la même affinité que le récepteur Flt-1 et se comporte comme un « anti-VEGF ». Comme dans le cas des autres facteurs de croissance, ces récepteurs à tyrosine-kinase sont dimérisés par des ponts disulfures. Le VEGF se lie à ses récepteurs sous la forme d'homodimères. Un complexe entre le VEGF et le deuxième domaine du type immunoglobuline du récepteur Flt-1, crucial dans la liaison du VEGF, a été récemment cristallisé et sa structure déterminée à 1,8 Å. Le récepteur Flt-1 lie le VEGF et le PLGF. Le récepteur Flk-1/KDR lie le VEGF-A et le VEGF-C. Enfin, un troisième récepteur a été isolé récemment, Flt-4, qui lie le VEGF-C.

L'inactivation des gènes du VEGF et de ses récepteurs chez la souris par recombinaison homologue entraîne une létalité plus ou moins précoce et des anomalies majeures du développement vasculaire. L'inactivation du gène du VEGF-A, même à l'état hétérozygote est létale à 8,5 jours de vie embryonnaire et entraîne un retard de la différenciation endothéliale, une diminution du bourgeonnement capillaire, un assemblage anormal des vaisseaux avec quasi absence de vaisseaux de taille moyenne et un élargissement de vaisseaux de petit calibre. L'inactivation du récepteur Flt-1 du VEGF provoque une létalité à 8,5 jours et une anomalie de la formation des vaisseaux mais la différenciation des cellules endothéliales, telle qu'elle peut être appréciée par différents marqueurs spécifiques de ces cellules, est normale. L'inactivation du récepteur Flk-1 empêche la formation de cellules endothéliales et entraîne l'absence d'hématopoïèse primitive et définitive dans les sacs vitellins. La létalité s'observe à 7,5-8,5 jours. Cette absence d'ilôt sanguin observée chez les animaux Flk-1 -/- est un argument en faveur d'une origine commune aux cellules vasculaires et sanguines (hémangioblaste). Le récepteur Flk-1 assurerait une localisation correcte des précurseurs mésodermiques dans l'embryon. A l'inverse, la surexpression du VEGF au cours de l'embryogénèse provoque des anomalies vasculaires. Ainsi, l'administration de VEGF recombinant chez la caille au stade de cinq somites entraîne une vascularisation anormale dans des zones normalement avasculaires avec comme conséquence le développement excessif et la fusion de vaisseaux, la formation de sacs vasculaires et l'oblitération de vaisseaux normaux.

Le VEGF pourrait jouer un rôle pathologique en provoquant une angiogénèse excessive, notamment dans les syndromes oculaires de néovascularisation tels qu'on les observe au cours de la rétinopathie proliférative de l'adulte, de l'occlusion de la veine centrale de la rétine, de l'hyperoxie rétinienne chez le prématuré et dans certains cas de dégénérescence maculaire chez l'adulte. On observe en

effet une élévation des taux de VEGF dans les différents liquides oculaires au cours des rétinopathies diabétiques prolifératives ou dans les phases actives de néovascularisation iridienne. Il existe une relation entre l'élévation des taux de VEGF et la sévérité de la rétinopathie diabétique. Enfin, il est possible de créer des modèles expérimentaux de néovascularisation rétinienne chez le primate et de corriger cet effet par des stratégies neutralisant le VEGF.

L'angiogénèse observée au cours du développement des tumeurs malignes semble jouer un rôle majeur dans la croissance de ces tumeurs et dans l'apparition de métastases. Plusieurs arguments directs sont en faveur de cette hypothèse : des composés inhibiteurs de l'angiogénèse sont capables d'arrêter la croissance tumorale *in vivo* ; de même, des anticorps monoclonaux dirigés contre des facteurs de croissance vasculaires entraînent une rémission tumorale. D'autres éléments plaident, de façon indirecte, en faveur du rôle de l'angiogénèse dans la progression tumorale : la croissance des tumeurs est proportionnelle à leur vascularisation ; il existe une corrélation entre croissance cellulaire tumorale et nombre de cellules vasculaires ; l'apparition de la néovascularisation provoque une croissance tumorale dans les carcinomes pancréatiques chez la souris transgénique et dans les mélanomes malins chez l'homme.

L'hypothèse émise par J. Folkman, il y a plus de vingt ans, était que la tumeur était capable de produire un (ou des) facteur(s) angiogénique(s) agissant de façon paracrine sur les cellules endothéliales. Les macrophages et les mastocytes pourraient contribuer aussi au bourgeonnement capillaire induit par la tumeur. Dans ces conditions, une conversion phénotypique maligne de la cellule endothéliale apparaît. Alors que ces cellules ne se divisent qu'exceptionnellement chez l'adulte normal (une fois tous les trois ans), en cas de tumeur, elles peuvent se multiplier, participer à la destruction de la membrane extracellulaire pour créer un nouveau vaisseau qui s'élabore de façon définitive par remodelage. Plusieurs arguments montrent que le VEGF est un composant essentiel de l'angiogénèse tumorale : le VEGF est exprimé dans de nombreux types de tumeurs ; il existe une corrélation entre le taux de VEGF dans le tissu tumoral, le plasma et le potentiel malin des tumeurs ; il est possible d'inhiber *in vitro* et *in vivo* l'angiogénèse tumorale par des anticorps anti-VEGF ou par une stratégie d'inactivation de son récepteur Flk-1 (dominant négatif). Les premiers travaux utilisant les anticorps anti-VEGF *in vivo* ont montré des régressions de tumeurs expérimentales chez la souris Nude. Ils débouchent actuellement sur des protocoles permettant une application clinique.

La participation du VEGF en pathologie tumorale est aussi suggérée, indirectement, dans la maladie de Von Hippel Lindau. Cette affection autosomale dominante se traduit à un âge jeune par l'existence de tumeurs vasculaires (hémangioblastomes) au niveau de la rétine et du système nerveux central. Il existe aussi fréquemment des cancers du rein à cellules claires ou des kystes rénaux, des phéochromocytomes, des kystes ou des tumeurs pancréatiques. La base moléculaire de cette affection a été découverte par clonage positionnel du

gène dans des familles atteintes de cette maladie. Le gène en cause est l'élongine. Les mutations identifiées et responsables de la maladie conduisent à une protéine absente, tronquée ou modifiée. La protéine Von Hippel Lindau interagit avec les élongines B et C et une protéine Cul-2. Ce complexe agirait d'une façon encore inconnue pour stabiliser des mRNAs inductibles par l'hypoxie tel que le VEGF. Cette « superstabilisation » du VEGF aboutirait donc à une croissance vasculaire accrue et favoriserait la croissance tumorale.

Plusieurs inhibiteurs de l'angiogénèse ont été découverts récemment et deux d'entre eux semblent prometteurs. Il s'agit de fragments protéiques extraits et caractérisés dans des milieux de culture de cellules tumorales. L'angiostatine est une protéine de 38 Kda et correspond à un fragment du plasminogène. L'endostatine (20 Kda) est issue du collagène XVIII. Dans les deux cas, ces composés inhibent *in vitro* la croissance des cellules endothéliales et *in vivo* la croissance de tumeurs malignes greffées chez la souris Nude.

Il existe des situations pathologiques cliniques dans lesquelles il est désirable de provoquer une angiogénèse. C'est le cas des maladies ischémiques liées à une thrombose artérielle, telle que l'artériopathie oblitérante des membres inférieurs et l'ischémie myocardique. Un modèle d'ischémie unilatérale de la patte postérieure chez le lapin a été mis au point par l'équipe de J. Isner. L'administration par bolus intraveineux de 500 à 1000 µg de VEGF-A 165 humain augmente la circulation collatérale dans le territoire oblitéré et améliore les différents index hémodynamiques de circulation au niveau des membres inférieurs. Un résultat similaire est obtenu par transfert génique du cDNA du VEGF (DNA isolé, « nu »). Un protocole thérapeutique chez l'homme a récemment débuté. Les premières observations montrent une amélioration de la circulation collatérale dans l'artérite des membres inférieurs avec augmentation du flux basal au niveau des membres inférieurs et du flux stimulé par la nitroglycérine. Il est possible aussi d'observer une angiogénèse myocardique lors de l'oblitération chronique de la coronaire chez le porc. La perfusion de VEGF recombinant par pompe osmotique dans le territoire ischémique augmente le nombre de capillaires, améliore la relaxation artérielle dépendante de l'endothélium ainsi que la fonction régionale du ventricule gauche.

D'autres gènes importants participent au modelage vasculaire au cours de l'angiogénèse. Les récepteurs tyrosine-kinase Tie-1 et Tie-2 sont exprimés précocément dans les néovaisseaux et leur inactivation conduit à une létalité précoce. Dans le cas du gène Tie-1, la létalité s'observe entre le 14<sup>e</sup> jour de la vie embryonnaire et la naissance. On observe des hémorragies à partir de vaisseaux mal formés, une dilatation de vaisseaux de grand calibre. L'inactivation du gène Tie-2 entraîne une létalité au 10<sup>e</sup> jour, une raréfaction des bourgeonnements vasculaires. Les ligands du récepteur Tie-2, angiopoïétine-1 et -2, ont été récemment caractérisés. Ces deux protéines de 75 Kda environ partagent 60 % d'homologie. Elles possèdent un domaine « coiled-coil » et un domaine de type fibrinogène. L'angiopoïétine-1 et -2 se lient au récepteur Tie-2 et non au récepteur

Tie-1, avec une affinité similaire (3 nmoles). Fait remarquable, l'angiopoïétine-1 est un ligand activateur, capable d'autophosphoryler Tie-2 dans les cellules endothéliales. En revanche, l'angiopoïétine-2 n'est pas capable, par elle-même, d'autophosphoryler Tie-2. En fait, l'angiopoïétine-2 inhibe l'action phosphorylante de l'angiopoïétine-1 sur Tie-2. L'angiopoïétine-1 est exprimée chez le fœtus et chez l'adulte dans de nombreux tissus (système nerveux central, intestin, muscles striés, organes génitaux et, en faible quantité, dans le cœur et le foie). L'angiopoïétine-2 est exprimée chez l'adulte dans l'ovaire, le placenta et l'utérus. Elle pourrait jouer un rôle essentiel dans l'angiogénèse physiologique qui accompagne le cycle ovarien. Les angiopoïétines sont secrétées par des cellules péri-vasculaires et agissent via leur récepteur sur les cellules endothéliales. L'angiopoïétine-1 pourrait promouvoir le remodelage vasculaire lors de l'ontogénèse. L'angiopoïétine-2 pourrait intervenir dans le processus de stabilisation du vaisseau lors de phénomènes d'angiogénèse physiologique chez l'adulte. Le rôle important du système angiopoïétine-récepteur Tie a été montré récemment par la découverte d'une mutation du gène du récepteur Tie-2 dans deux familles atteintes de télangiectasie : le récepteur Tie-2 présentait une mutation substitutive proche du premier domaine tyrosine-kinase provoquant une activation du récepteur. La formation des vaisseaux résulte donc d'un équilibre subtil entre angiopoïétine et récepteurs Tie dans la mesure où une inactivation ou une suractivation du récepteur peut entraîner des malformations vasculaires.

La génétique moléculaire de la télangiectasie hémorragique héréditaire (maladie de Rendu Osler) a permis aussi de progresser sur la compréhension des mécanismes de l'angiogénèse. Cette affection est caractérisée par des accidents hémorragiques à type d'épistaxis dans l'enfance ou d'hémorragies gastro-intestinales, des lésions vasculaires cutanées et viscérales (télangiectasie de la face et de la sphère ORL), des malformations artério-veineuses (fistules) pulmonaires, hépatiques et du système nerveux central. Cette maladie autosomale dominante est hétérogène puisque deux gènes au moins en sont responsables, l'endogline et un récepteur kinase. L'endogline est une protéine de liaison du TGF $\beta$  sur les cellules endothéliales et son anomalie est responsable d'une des deux formes génétiques de la maladie. La mutation d'un autre gène, un récepteur kinase similaire à l'activine, est responsable de la deuxième forme de télangiectasie hémorragique héréditaire identifiée sur le plan moléculaire. L'endogline, qui existerait sous la forme de dimère, lie le TGF $\beta$  qui active à son tour un récepteur de croissance cellulaire composé de deux sous-unités hétérologues : l'une d'entre elle est un récepteur kinase, l'autre étant le récepteur kinase de type activine. Cette interaction déclencherait la signalisation intracellulaire et la croissance des cellules endothéliales. La nature de la deuxième sous-unité du récepteur TGF $\beta$  n'est pas connue.

Comme on le voit, les connaissances fondamentales sur les mécanismes de la vasculogénèse et de l'angiogénèse ont littéralement explosé au cours de ces dernières années. Elles devraient permettre de mieux comprendre les phénomènes de l'angiogénèse physiologique chez l'adulte (cycle menstruel chez la femme,

développement de l'angiogénèse au cours de l'exercice musculaire). La stimulation de l'angiogénèse peut être désirable lors des ischémies chroniques pathologiques. A l'inverse, ces mêmes mécanismes peuvent être délétères lorsqu'ils sont mis en jeu au cours d'une conversion phénotypique de la cellule endothéliale quiescente en cellule endothéliale « maligne », lors de processus cancéreux. L'angiogénèse indésirable qui accompagne la progression des tumeurs constitue une cible adjuvante de choix dans la thérapeutique des cancers.

P. CORVOL

#### 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, S. FUCHS, J. PHILIPPE, G. EGIDY, F. BONNET  
(départ Octobre 97)

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**

Les principales questions posées sont :

Quels sont les facteurs nucléaires permettant une expression du gène de la rénine dans les cellules juxtaglomérulaires du rein et les cellules chorioniques ? ; Quels sont les mécanismes responsables au niveau transcriptionnel d'une inhibition de la sécrétion de rénine en réponse à une augmentation du calcium intracellulaire ?

Deux modèles de cellules productrices de rénine ont été particulièrement utilisés pour la régulation de la transcription du gène de la rénine : les cellules chorioniques et les cellules Calu-6 dérivées d'un carcinome pulmonaire. L'analyse fonctionnelle *ex vivo* du promoteur de la rénine et l'identification des séquences *cis* ont été effectuées 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 du gène de la rénine par l'AMPc. 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 (Germain *et al.*, 1997a).

Le criblage d'une banque de cosmides ayant permis de cloner 19 Kb de la région 5', le premier intron dans sa totalité (4.3 Kb) ainsi que 5 Kb de la région 3', ouvrent de nouvelles perspectives pour identifier les régions régulatrices du gène. Sur ces nouvelles régions, nous avons d'abord étudié le rôle du premier intron sur l'activité transcriptionnelle du promoteur rénine et montré la présence d'un « silencer » dans le modèle des cellules Calu-6 (Germain *et al.*, 1997b).

Nous voulons développer les recherches suivantes :

a) *Cartographie de nouvelles régions régulatrices du gène de la rénine.* La fonctionnalité des régions distales sera effectuée par transfection dans les trois lignées cellulaires productrices de rénine : cellules chorioniques, cellules Calu-6 et cellules As4.1 pour déterminer les séquences de régulation importantes. b) *Détermination des mécanismes transcriptionnels impliqués dans la régulation par le calcium intracellulaire.* 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. c) *Clonage des facteurs de transcription spécifiques des tissus exprimant la rénine.* Ceci sera effectué par plusieurs approches dont la technique de simple hybride. 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**

Principales questions posées :

Quelle est la spécificité de l'ECE vis-à-vis des substrats et des inhibiteurs ? ; Quel est le rôle de l'ECE dans un contexte physiopathologique ?

Nous avons exprimé les trois isoformes de l'ECE-1 en cellules eucaryotes. Des anticorps ont été obtenus contre des peptides différenciant l'isoforme a de l'isoforme b/c et contre des peptides situés sur la partie commune C-terminale de la molécule, tous spécifique de l'ECE-1. Dans le but de permettre une production et une purification aisée de l'enzyme, 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 vis-à-vis des substrats et des inhibiteurs, bien qu'elle soit sécrétée principalement sous forme de monomère, contrairement à l'ECE-1a qui est exprimée sous forme de dimère (Korth *et al.*, 1997). Un dosage par luminescence de l'activité ECE-1a a été mis au point en cellules CHO. Cette lignée recombinante exprimant de manière stable le récepteur ET-A et une construction associant 6 séquences TRE a permis de mettre en évidence deux sites de conversion de la bigET-1 par l'ECE-1a : une conversion intracellulaire, non inhibée par le phosphoramidon et une conversion extracellulaire, inhibée par le phosphoramidon qui ont été caractérisés. Cette lignée est aussi le seul système qui permet de tester la capacité des inhibiteurs à pénétrer dans la cellule (Parnot *et al.*, 1997).

Nous voulons poursuivre cette recherche dans les directions suivantes :

*e) Distribution et caractérisation de l'ECE-1 humaine.* Un profil d'expression du mRNA de l'ECE-1 et de la protéine identique a été observé dans la plupart des tissus humains non pathologiques. Son expression est particulièrement élevée dans les systèmes cardiovasculaire, reproducteur et endocrine (Korth *et al.*, soumis). *f) Rôle de l'ECE dans la surrénale.* L'expression des trois gènes de l'ECE sera étudiée dans les adénomes de Conn par les techniques de Northern Blot, d'hybridation *in situ* et d'immunohistochimie. *g) Recherche d'inhibiteurs.* En utilisant les banques de peptides phosphiniques développés par chimie combinatoire, nous essayons de développer des inhibiteurs spécifiques de l'ECE. *h) Rôle du système endothéline dans l'angiogénèse.* L'expression (hybridation *in situ*, immunocytochimie) et la régulation différentielle (RT/PCR) du système endothéline sera étudiée dans les adénocarcinomes de colon, par comparaison au tissu sain et au tissu tumoral.

## **Autres travaux**

### *Quantification du mRNA 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 (LeMoullec *et al.*, 1997).

## II — PEPTIDES — HORMONES ET DÉVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE

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

### 1. Angiotensine et Endothélines

Les deux types de peptides-hormones vasoactifs dont nous avons choisi d'étudier le rôle dans le développement, l'angiotensine II et les endothélines, sont exprimés très tôt dans le développement embryonnaire. L'inactivation des gènes correspondants produit des phénotypes qui démontrent, dans le cas des endothélines, ou ne démontrent pas, dans le cas de l'angiotensine II, un rôle dans l'organogénèse. Pour faciliter l'étude de ce rôle nous avons mis au point un modèle expérimental d'inactivation de facteurs de croissance, beaucoup plus simple et d'utilisation plus souple que le « Knock Out » génomique. Ce modèle d'inactivation pharmacologique a été testé sur le système endothéline 1-récepteur de type ETA, en vue d'élargir son application aux autres peptides-hormones, et à des facteurs de nature différente.

L'embryon d'oiseau a un développement proche de celui des mammifères surtout pendant les phases précoces. Contrairement aux mammifères l'embryon de poulet est facilement accessible et n'est pas soumis aux influences maternelles. A condition de montrer au préalable la similitude, chez le poulet et les mammifères, des processus étudiés, il est possible d'utiliser l'embryon comme modèle expérimental, puis de transposer les résultats chez les mammifères en tenant compte d'éventuelles différences connues ou observées.

Nous poursuivons actuellement cette démarche à la fois pour le SRAA et pour les endothélines.

#### *A. Le récepteur de l'angiotensine de poulet*

Après avoir cloné, séquencé et caractérisé pharmacologiquement un récepteur de l'angiotensine de poulet (ATp), nous voulons chercher s'il existe un autre récepteur comme chez les mammifères et comme des données physiologiques anciennes et récentes le suggèrent fortement chez le poulet.

Le projet en cours (collaboration avec H. NISHIMURA, University of Tennessee) est d'une part de rechercher par des moyens de physiologie, de pharmacologie et de biologie moléculaire cet éventuel récepteur, afin de disposer de plus d'éléments du SRAA aviaire, et d'autre part d'utiliser le modèle expérimental de l'embryon de poulet pour démontrer si l'angiotensine II a effectivement un rôle de facteur de croissance pendant le développement embryonnaire.

#### *B. Les récepteurs des endothélines d'oiseau*

Nous avons déjà employé avec succès le modèle expérimental d'inactivation pharmacologique du récepteur ETA de l'endothéline 1 sur l'embryon de poulet

(Kempf *et al.* soumis pour publication). Les malformations obtenues reproduisent celles obtenues par le « Knock Out » des gènes ET1 ou ETA chez la souris. Il s'agit principalement de malformations cardiovasculaires et de la mandibule. Le cœur et les gros troncs vasculaires à l'entrée et à la sortie du cœur sont particulièrement affectés : défaut de septation ventriculaire, truncus arteriosus persistant et anomalies de branchement des artères dérivées des artères branchiales. Toutes ces malformations peuvent être attribuées à une participation défectueuse des cellules des crêtes neurales à ces structures, et sont donc considérées comme des neurocristopathies qui reproduisent des pathologies variées connues chez l'homme.

Le projet sera poursuivi pour déterminer si ce défaut de participation des cellules de crête neurale résultait d'un défaut de migration, de prolifération ou de différenciation des cellules de CN. Un second objectif est d'identifier les gènes en aval de ETA, essentiellement des facteurs de transcription, qui sont effectivement responsables de ces anomalies.

## 2. Angiogénèse normale et pathologique

Le récepteur de l'angiotensine II déjà cloné, l'ATp, est exprimé dans certains endothéliums et, dans l'embryon, un niveau d'expression très élevé est observé dans la membrane chorio-allantoïdienne (CAM). Cette membrane est hautement vascularisée et est le siège d'une très forte activité angiogénique pendant une dizaine de jours. Par ailleurs, les récepteurs des endothélines de type ETA et ETB de poulet que nous avons clonés sont exprimés, respectivement, dans les muscles lisses et l'endothélium vasculaire. Nous utiliserons la CAM, qui fait partie des annexes de l'embryon, à la fois comme organe type où se produit normalement une angiogénèse intense pour étudier les mécanismes d'interactions cellulaires, et comme outil pour tester les activités angiogéniques ou antiangiogéniques de divers composés.

Par exemple, la CAM peut facilement être utilisée pour « greffer » un morceau de tumeur fraîche ou un nodule de tissu tumoral en culture afin de tester les propriétés de composés intervenant naturellement dans l'angiogénèse ou de composés destinés à bloquer celle-ci.

Un second modèle expérimental sera mis en œuvre pour l'étude de l'angiogénèse tumorale : la culture en trois dimensions de cellules tumorales. Cette technique déjà ancienne permet de maintenir en culture pendant des durées non limitées des nodules qui ont de 10 à 20 cellules d'épaisseur et quelques millimètres de diamètre. Ces nodules prolifèrent, reconstituent parfois des structures et expriment des gènes caractéristiques de la tumeur dont ils dérivent. Ce système se prête à des co-cultures aussi bien qu'à des tests de substances destinées à bloquer la formation de néo-vaisseaux dans le nodule soit en empêchant le signal émis par les cellules tumorales, soit en bloquant l'association de cellules endothéliales

entre elles, ou de cellules endothéliales avec des pericytes. Il manque à ce système l'élément hémodynamique de la circulation. Il est envisagé d'associer successivement les deux modèles expérimentaux proposés dans ce rapport pour obtenir des nodules vascularisés par le sang de l'embryon de poulet circulant dans des vaisseaux formés en culture.

Un facteur de transcription récemment cloné chez les mammifères et appelé EPAS-1 ou HIF-1 $\alpha$  est en cours de clonage chez le poulet au laboratoire. Son expression spatiotemporelle dans le développement embryonnaire et dans différentes situations physio-pathologiques dépendant d'une angiogénèse importante, est actuellement étudiée.

### **3. Système rénine-angiotensine-aldostérone et inactivation du récepteur de l'aldostérone**

Dans la continuité des recherches sur le rôle du système rénine-angiotensine (SRAA) dans le développement nous avons utilisé les souris dépourvues du gène du récepteur de l'aldostérone (collaboration avec G. Schütz et S. Berger) pour étudier les conséquences de cette délétion sur l'équilibre du SRAA. Cette étude a été faite au niveau moléculaire (RT-PCR semi-quantitative) et anatomo-histologique (hybridation *in situ* et immunodétection). Malgré un déséquilibre profond démontré par les concentrations très excessives (augmentation de la concentration supérieure à 100 fois) de rénine circulante, les conséquences sur les autres composants du SRAA apparaissent modérées même lorsqu'elles sont statistiquement significatives. Les changements les plus remarquables chez les jeunes souris MR<sup>-/-</sup> de 8 jours après la naissance (ces animaux mutants meurent à 10 jours à cause d'une perte hydrosodée non compensée) sont une augmentation de l'angiotensinogène et du récepteur AT<sub>1</sub> dans le foie, une augmentation de la rénine dans le rein qui apparaît modérée (environ 5 fois) par rapport à celle de la rénine circulante (> 100 fois) et une très forte augmentation de la rénine dans le cortex surrénalien. Ni le récepteur AT<sub>1</sub>, ni l'enzyme de conversion (ACE) ne sont modifiés significativement. La rénine apparaît donc comme l'élément principal régulateur de la boucle angiotensine du SRAA. C'est par la rénine que l'organisme cherche à compenser la perte hydrosodée provoquée par l'absence d'aldostérone.

### **III — Biochimie structurale de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA)**

Équipe : P. CORVOL, M. T. CHAUVET (départ en septembre 1998), A. MICHAUD, T. WILLIAMS (départ en juillet 1997), D. COATES (poste vert 1997), 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. Les deux sites actifs sont fonctionnels mais présentent, toutefois des différences : différence d'affinité et de vitesse de dégradation vis-à-vis des substrats naturels et différence vis-à-vis de l'influence des ions chlorure sur l'activité. Ainsi l'activité enzymatique mesurée, d'après la méthode de Cushman, par la libération de l'acide hippurique à partir du substrat synthétique Hip-His-Leu est essentiellement due au domaine C-terminal ; par contre 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 principale du domaine N-terminal avec des constantes cinétiques de l'ordre de celles des substrats naturels déjà identifiés (angiotensine I et bradykinine, hydrolysés par les deux sites actifs). Nous cherchons, actuellement :

a) à déterminer la spécificité de chacun des sites actifs vis-à-vis de substrats naturels ou synthétiques et des inhibiteurs spécifiques de chacun de ces sites. Notre objectif est 1) d'identifier des substrats strictement hydrolysés par un seul des deux sites, ceci pour cerner le rôle du site N-terminal et celui de l'ECA testiculaire qui conserve uniquement le site actif C-terminal. 2) de dissocier les effets de l'ECA sur le système rénine angiotensine de ceux sur le système hématopoïétique par action d'inhibiteurs spécifiques de chacun des deux domaines ;

b) à déterminer les caractéristiques enzymatiques d'Acer et le rôle, au cours du développement, des deux isoformes de l'ECA, chez la drosophile : Ance et Acer. En effet, une forme homologue de l'ECA, soluble et ne contenant qu'un seul site actif a été caractérisée chez *drosophila mélanogaster*, Ance, puis un second gène a été identifié et correspond à une protéine présentant 74 % d'homologie de séquence primaire en acides aminés avec Ance et nommé : Acer ;

c) 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.

**2) L'ECA est une protéine membranaire de type I** qui présente une forme soluble active issue de la protéolyse enzymatique de la protéine membranaire. L'étude du mécanisme de libération par protéolyse de la forme circulante présente un intérêt général puisque il intéresse des protéines telles que la protéine précurseur du peptide amyloïde (APP), plusieurs facteurs de croissance dont le proTGF $\alpha$  ou des récepteurs de protéines d'adhésion cellulaire.

L'étude de ce mécanisme de libération a été un de nos objectifs majeurs : routage cellulaire de l'ECA, localisation du site de clivage soit dans des cellules de mammifères (cellules CHO) soit dans un système de levure (*pichia pastoris*),

afin de déterminer si une sécrétase homologue à celle des cellules de mammifères pouvait être identifiée, un éventuel clonage de cette enzyme, chez la levure, semblant *a priori* plus simple.

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

### 1. Spécificité vis-à-vis de nouveaux substrats

L'utilisation des trois enzymes recombinantes produites par les cellules CHO transfectées par le cDNA de l'ECA membranaire soit normal soit portant des mutations sur les deux histidines du site actif N-terminal ou du site actif C-terminal permet de déterminer les spécificités de chaque site actif.

La dégradation du peptide hémorégulateur NAcSer-Asp-Lys-Pro (AcSDKP) qui exerce une régulation négative sur la prolifération des cellules hématopoïétiques est due à l'action initiale de l'ECA par libération du dipeptide KP. Pour la première fois un substrat hautement spécifique du domaine N-terminal avec des constantes cinétiques de l'ordre de celles des substrats naturels déjà identifiés, a pu être mis en évidence. L'ECA serait ainsi impliquée, par l'intermédiaire de son domaine N-terminal, dans la régulation de l'hématopoïèse *in vitro* et *in vivo*.

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. Nous poursuivons actuellement cette étude afin de déterminer quel acide aminé, et dans quelle position confère au peptide NacSDKP sa spécificité vis-à-vis du site actif N-terminal de l'ECA. Nous déterminons ainsi les constantes cinétiques de l'hydrolyse par les trois formes recombinantes de l'ECA de peptides de longueur croissante homologues de la séquence de AcSDKP : BzDKP, BzGDKP, BzGSDKP, afin de voir si l'introduction du résidu aspartate en position P1 est entièrement responsable de la spécificité N-terminale. Nous pouvons évaluer l'importance du résidu de sérine en position P2 et savoir si cette spécificité est conservée pour un pentapeptide. D'autre part nous testons l'effet de l'acétylation du résidu lysine en P'1 dans le but de remplacer la détection du dipeptide KP par celle plus aisée de K(Ac)P, dans notre système de dosage de l'hydrolyse d'AcSDKP par l'ECA. Les conclusions majeures de cette étude sont : 1) aucun peptide testé présente une spécificité supérieure à celle du peptide naturel AcSDKP ; 2) L'apparition du résidu aspartate en P1 déclenche un début de spécificité N-terminale mais le résidu de sérine en position P2 augmente très fortement cette spécificité qui n'est pas conservée lors

du passage à un pentapeptide. D'autre part l'acétylation de la fonction basique libre du résidu de lysine diminue l'efficacité de ce peptide par rapport à celle d'AcSDKP mais permet de conserver cependant une spécificité en faveur du domaine N-terminal.

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

Étant donné le rôle du domaine N-terminal dans la dégradation du peptide AcSDKP, il est important de trouver des inhibiteurs spécifiques de ce domaine. Leur administration, lors de chimiothérapie, permettrait d'augmenter *in vivo* la stabilité d'AcSDKP et donc de maintenir 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 16 fois inférieure à celle déterminée avec l'angiotensine I comme substrat. Cet inhibiteur est donc le plus approprié pour un usage clinique visant à protéger les cellules hématopoïétiques souches durant l'administration de drogues cytotoxiques ou l'exposition à des rayonnements.

Nous participons au 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), cette étude étant reliée au projet INSERM Progrès.

## B. Comparaison des deux isoformes d'ECA chez *drosophila ménalogaster*

Les deux isoformes de l'ECA, (Ance et Acer) issues de deux gènes distincts ont été exprimées dans le système de levure, *Pichia pastoris*. Ces deux enzymes solubles correspondent à des glycoprotéines d'environ 74 kDa de masse moléculaire. Elles ont été comparées sur le plan enzymatique, immunologique et leur expression respective au cours du développement de la nymphe a été étudiée. Nous avons précédemment montré qu'Ance a des caractéristiques enzymatiques qui la rapproche plus du domaine C que du domaine N actif de l'ECA somatique des mammifères. Acer se distingue d'Ance par trois caractères majeurs 1) elle

n'hydrolyse pas l'AngI ; 2) elle clive plus efficacement la Leu5-enképhalinamide ; 3) elle est beaucoup moins performante qu'Ance vis-à-vis des substrats possédant un doublet dibasique en position C-terminale. D'autre part Ance et Acer présentent des profils d'expression différents durant le développement de la nymphe. L'apparition d'Ance (stade P6) précède celui de Acer (stade P10-P11) et les deux expressions apparaissent comme étant sous le contrôle des écdystéroïdes. Ces résultats suggèrent des rôles différents pour Ance et Acer durant la morphogénèse de *Drosophila melanogaster*.

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. Cette étude a été entreprise 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*). Des cristaux préliminaires ont été obtenus. 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 s'identifie à TACE ou à une ADAM homologue. Dans cette perspective une collaboration a été entreprise avec le Dr R.A. Black. Le cDNA correspondant à l'ECA endothéliale (ECA somatique) humaine et celui correspondant au domaine C-terminal ont été transfectés dans des cellules de fibroblastes TACE -/- avec ou non transfection du cDNA de TACE et la solubilisation des deux formes de l'ECA est étudiée. Dans un second temps l'effet du TAPI (hydroxamate, inhibiteur de TACE) sur la sécrétion sera évalué.

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

Équipe : C. TOUGARD, E. VILA-PORCILE, S. HAMMAMI, A. BARRET, P. LARDEMER, E. ETIENNE

La compréhension des mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans les cascades d'événements protéolytiques qui vont donner naissance aux peptides actifs des systèmes endothéline et rénine-angiotensine ainsi que l'identification des compartiments subcellulaires mis en jeu dans ces maturations constituent l'objectif général des recherches de ce groupe.

##### **A. Le système endothéline dans les cellules endothéliales et les cellules antéhypophysaires**

Au cours de l'année écoulée, nos recherches sont restées centrées sur la localisation subcellulaire de l'enzyme de conversion de l'endothéline (ECE), l'enzyme-clé responsable de la dernière étape de maturation protéolytique du précurseur de l'endothéline qui donne naissance au peptide actif. Cette enzyme est une protéine membranaire de type II. L'épissage alternatif de l'ARNm de l'ECE-1, qui est la forme majoritaire de l'ECE, entraîne la formation, chez l'homme, de trois isoformes (ECE-1a, ECE-1b, ECE-1c) qui ne diffèrent les unes des autres que par leurs domaines cytosoliques. Seules les 2 isoformes ECE-1a et ECE-1c ont, pour l'instant, été identifiées chez le rat. Ces isoformes sont exprimées à des taux variables dans différents tissus et dans des modèles de cellules endothéliales en culture mais l'isoforme ECE-1c est en général l'isoforme majoritaire. Il a été montré, très récemment, que les isoformes ECE-1a et ECE-1c sont présentes principalement à la surface cellulaire, alors que l'isoforme ECE-1b serait retenue au niveau de l'appareil de Golgi.

La question fondamentale qui se pose est de comprendre le rôle physiologique joué par ces différentes isoformes à l'intérieur et à la surface des cellules. La régulation de l'expression de chacune d'entre elles pourrait intervenir dans une modulation fine de la formation locale d'endothéline.

### ***1. Étude de la distribution subcellulaire des isoformes de l'ECE-1 dans des cellules CHO transfectées***

Cette étude est réalisée actuellement en collaboration avec O. Valdenaire (INSERM U 460. Paris) afin de caractériser les déterminants structuraux responsables de la localisation des différentes isoformes de l'ECE-1. Elle est menée dans des cellules CHO transfectées par une approche de mutagenèse dirigée des domaines cytosoliques spécifiques de chacune des isoformes humaines. Cette analyse devrait nous permettre d'obtenir des informations sur les mécanismes de régulation de cette distribution différentielle.

### ***2. Étude de l'expression et de la localisation de l'ECE-1 dans l'antéhypophyse du rat***

Les endothélines sont connues pour exercer des effets régulateurs sur la sécrétion de certaines hormones antéhypophysaires. De plus, les endothélines ainsi que les ARNm des endothélines et des récepteurs des endothélines ont été détectés dans l'antéhypophyse suggérant des interactions paracrines et/ou autocrines. Aucune information concernant l'expression de l'ECE dans l'antéhypophyse n'ayant été obtenue jusqu'alors, nous avons recherché si cette enzyme-clé dans la formation d'endothéline active était exprimée localement dans les cellules glandulaires de l'antéhypophyse.

Nous avons constaté par des approches conjointes d'immunochimie et d'immunocytochimie que l'enzyme était exprimée dans l'antéhypophyse du rat et était localisée non seulement au niveau des cellules endothéliales tapissant la paroi des capillaires mais également au niveau de quelques cellules glandulaires. Nous poursuivons actuellement cette étude afin d'identifier par des doubles marquages immunocytochimiques les types cellulaires qui expriment cette enzyme et de définir ainsi le rôle qu'elle pourrait jouer dans une production locale d'endothélines.

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

### ***1. Localisation subcellulaire des composants du système rénine-angiotensine***

Cette étude s'inscrit dans la continuité des recherches que nous avons menées précédemment sur la localisation subcellulaire des composants du système rénine-angiotensine, par des immunomarquages multiples en microscopie électronique avec de l'or colloïdal, au niveau des grains de sécrétion des cellules glandulaires de l'antéhypophyse du rat (Vila-Porcile et Corvol. 1998). Ces résultats permettaient de supposer l'existence d'un processus de maturation à l'intérieur même du compartiment de stockage de tous les types de cellules glandulaires puisque,

bien qu'ils soient exprimés à des niveaux divers, tous les composants du système rénine-angiotensine sont colocalisés dans les grains de sécrétion.

Nous avons poursuivi cette étude par immunopéroxydase au microscope électronique et constaté que, aussi bien dans les cellules glandulaires de l'antéhypophyse que dans les cellules lactotropes de la lignée GH3B6, tous les composants du système sont présents dans le réticulum endoplasmique rugueux, l'appareil de Golgi et les grains de sécrétion en formation, en particulier dans les cellules lactotropes et somatotropes.

Ces détections fournissent de bons arguments pour une synthèse effective des composants du système rénine-angiotensine dans les cellules hypophysaires du rat.

## *2. Sécrétion des composants du système rénine-angiotensine*

Pour explorer une éventuelle sécrétion des composants du système par les cellules hypophysaires, nous avons alors utilisé l'approche dite du « reverse hemolytic plaque assay » (RHPA) qui permet d'évaluer la sécrétion des cellules à l'échelle individuelle. Cette technique, mise au point sur les cellules GH3B6 qui se sont avérées capables de sécréter la plupart des composants du système rénine-angiotensine, a été ensuite appliquée sur les cellules hypophysaires normales.

Sur l'ensemble des cellules hypophysaires, le composant majoritairement sécrété est la prorénine. Si l'on considère le taux de sécrétion de chacun des types cellulaires identifiés par immunocytochimie, on constate que les cellules les plus actives sont les somatotropes et les lactotropes. Outre la sécrétion élevée de prorénine, les autres composants sont sécrétés par ces cellules à des taux plus réduits. En ce qui concerne les cellules gonadotropes, et en contradiction avec les résultats rapportés dans la littérature, le taux de sécrétion pour chacun des composants explorés a été très faible. Les autres types cellulaires apparaissent peu actifs. Nous poursuivons actuellement cette exploration fonctionnelle.

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

Équipe : C. LLORENS-CORTÈS, A. HUS-CITHAREL, N. DE MOTA, Z. LENKEI, S. ZINI (départ : Novembre 1997), G. VAZEUX (départ : Octobre 1997), A.-M. NUYT (départ : Juillet 1998), A. RÉAUX, X. ITURRIOZ

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 ( $AT_{1A}$  et  $AT_{1B}$ ) ou de type 2 ( $AT_2$ ). Injectés par voie intracérébroventriculaire, ces deux peptides augmentent la pression ar-

térielle, le comportement dipsique et la sécrétion de vasopressine (AVP). Notre objectif consiste à étudier : 1) les enzymes impliquées 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, dans le cerveau et l'hypophyse et à la périphérie.

## **1. Ectoenzymes et métabolisme de l'angII et de l'angIII cérébrales**

### **A. Organisation du site actif de l'APA**

Une première étude menée dans le laboratoire a montré que l'APA était bien une enzyme à zinc, caractérisée par les motifs HEXXH et WLXEG retrouvés dans toutes les aminopeptidases monozincs. Cette étude a mis en évidence que le glutamate 386 du motif HEXXH et le glutamate 408 du second motif WLXEG interviennent respectivement dans l'acte catalytique et dans la coordination du zinc ; l'APA présenterait ainsi un mécanisme catalytique de type général basique.

Nous avons continué la caractérisation du site actif de l'APA en nous intéressant particulièrement à une tyrosine (Tyr-471) présente dans le motif YXKG et conservée dans toutes les aminopeptidases monozincs. Nous avons muté la Tyr-471, et nous l'avons remplacé par une phénylalanine. La caractérisation du mutant nous a permis de mettre en évidence l'implication de l'oxygène phénolique de la Tyr-471 dans l'acte catalytique. L'utilisation de différents inhibiteurs et en particulier d'un pseudo-analogue de l'état de transition le  $\text{GluPO}_3\text{H}_2$ , nous a permis de déterminer le rôle exact de cette Tyr-471. La chute du pouvoir inhibiteur de ce composé pour le mutant suggère que la Tyr-471 serait impliquée dans la stabilisation de l'état de transition.

Ces données nous ont permis de proposer un modèle du mécanisme catalytique de l'APA.

### **B. Inhibiteurs de l'APA**

En suivant la démarche simple utilisée pour construire des inhibiteurs d'aminopeptidases tels que l'APN ou l'APB, un certain nombre de  $\beta$ -aminothiols capables de reconnaître le site catalytique et le sous-site S1 de l'APA ont alors été conçus.

En prenant en compte la spécificité de substrat de l'APA, des composés comme le Glu-thiol et l'Asp-thiol ont été préparés. Curieusement, ces molécules n'ont pas présenté l'affinité espérée pour cette enzyme, mais de plus, elles se sont avérées non sélectives. Partant de ces premiers modèles, les paramètres d'affinité et de sélectivité ont été améliorés en modifiant le groupement qui reconnaît le sous-site S1 de l'APA.

Les produits les plus intéressants obtenus dans cette étude sont les suivants :

- l'EC33 : (R,S) 3-amino-4-thio-butyl sulfonate, inhibiteur spécifique de l'APA (son pouvoir inhibiteur est 100 fois meilleur pour l'APA ( $K_i = 0,29 \mu\text{M}$ ) que pour l'APN) ;
- l'EC27 : (S) 2-aminopentane-1,5 dithiol, inhibiteur sélectif de l'APN (son pouvoir inhibiteur est 100 fois meilleur pour l'APN ( $K_i = 0,032 \mu\text{M}$ ) que pour l'APA).

### **C. Rôles physiologiques de l'aminopeptidase A et de l'aminopeptidase N dans le système rénine-angiotensine cérébral : Rôles respectifs de l'angII et de l'angIII dans le contrôle central des fonctions cardiovasculaires**

Dans un premier temps, en effectuant des expériences de métabolisme, *in vivo*, chez la souris nous avons démontré que l'APA et l'APN étaient respectivement impliquées dans le métabolisme de l'AngII et de l'AngIII cérébrales.

De plus, en bloquant, *in vivo*, successivement chacune de ces enzymes, il est apparu que pour induire une sécrétion de vasopressine, l'AngII devait être convertie en AngIII par l'APA dans le cerveau, suggérant que le peptide effecteur du SRA cérébral serait l'AngIII.

Afin de compléter ces données, nous avons étudié :

#### **1. La distribution régionale de l'activité de l'Aminopeptidase A dans le cerveau de rat**

\* chez le rat normotendu

Puisque l'AngIII semble avoir un rôle majeur au sein du SRA cérébral, l'enzyme qui lui donne naissance, l'APA devient une cible potentiellement intéressante. Il convient donc de l'étudier en détail, ce qui jusqu'alors n'avait pas été réalisé. Nous avons entrepris la mesure de l'activité enzymatique de l'APA en absence ou en présence d'un inhibiteur spécifique dans une vingtaine de noyaux cérébraux microdisséqués chez le rat mâle Sprague-Dawley selon la méthode du Professeur M. Palkovits.

Les plus fortes activités APA sont retrouvées dans l'organe vasculaire de la lame terminale (OVL), l'organe subfornical (SFO), l'éminence médiane, l'area postrema, l'hypophyse antérieure et postérieure, le noyau arqué, le noyau supraoptique et à un moindre degré, le noyau du tractus solitaire (NTS) et le noyau paraventriculaire. Toutes ces régions sont impliquées dans le contrôle de la pression artérielle, la prise de boisson ou la sécrétion des hormones hypophysaires. Des régions ne contenant pas de récepteurs  $AT_1$  comme le cortex moteur ou le cervelet présentent une activité APA très faible.

Ces résultats nous ont permis d'établir pour la première fois une cartographie détaillée de la distribution de l'APA dans le cerveau de rat. Il existe une très bonne corrélation entre cette distribution et la localisation des terminaisons des

voies angiotensinergiques et des récepteurs  $AT_1$  déjà décrite. Un tel parallélisme suggère que l'APA serait un des constituants du système rénine-angiotensine cérébral.

*\* chez le rat spontanément hypertendu*

Puisque nous trouvons des taux importants d'APA dans des régions cérébrales connues pour réguler les fonctions cardiovasculaires, il était intéressant de voir si l'activité de l'enzyme était modifiée par une situation physiopathologique mettant en jeu une activation du SRA.

Les rats spontanément hypertendus (SHR) appartiennent à une lignée génétiquement établie pour laquelle la pression artérielle peut dépasser de plus de 50 % celle des animaux normotendus. Chez ces animaux, on note dans le tissu cérébral une augmentation de l'activité rénine, des taux d'angiotensinogène, d'AngII et d'AngIII ainsi que du nombre des récepteurs  $AT_1$ . Cette hyperactivité du SRA cérébral pourrait être en partie à l'origine de leur état tensionnel élevé. Ces animaux constituent donc un bon modèle physiopathologique pour étudier les variations de l'activité APA dans le cerveau.

Dans la plupart des noyaux étudiés, nous avons observé une augmentation très significative de l'activité enzymatique chez le rat SHR, comparé à son témoin normotendu Wistar-Kyoto. Cette augmentation est particulièrement importante dans le SON, le noyau arqué, l'OVL, l'éminence médiane et le SFO où elle peut dépasser de 2,5 fois l'activité des animaux témoins. En revanche, aucune variation n'a été notée dans l'AP, l'hypophyse postérieure, le cortex moteur et le cervelet. L'activité de l'ECA n'est pas significativement modifiée dans le cerveau du rat SHR, bien que l'on note une tendance générale à la baisse.

*En conclusion*, l'activité de l'APA est globalement augmentée dans le cerveau du rat hypertendu, particulièrement dans des régions impliquées dans le contrôle de la pression artérielle.

Cette augmentation est parallèle à celle observée pour les récepteurs  $AT_1$ . Ceci suggère là encore un rôle de l'APA dans le SRA cérébral qui pourrait rendre compte du métabolisme plus rapide de l'AngII observée chez les animaux hypertendus.

**2. L'effet des inhibiteurs d'APA sur l'activité des neurones magnocellulaires vasopressinergiques du noyau supraoptique**

Afin de mieux comprendre le mode d'action des angiotensines (AngII et AngIII) sur la sécrétion de vasopressine, il nous apparaît intéressant d'étudier le comportement électrophysiologique des cellules magnocellulaires vasopressinergiques du noyau supraoptique, en présence des inhibiteurs d'APA. Ces expériences nous permettront de tester l'hypothèse selon laquelle l'AngIII est bien le peptide effecteur au niveau des neurones magnocellulaires vasopressinergiques. Des enregistrements extracellulaires des neurones vasopressinergiques dans le noyau supraoptique chez le rat anesthésié déshydraté (pendant 48h) ont été

effectué dans le laboratoire de pharmacologie des effets centraux de Roussel-Uclaf sous la direction du Dr P. Sanderson. L'injection intracérébroventriculaire (i.c.v) d'AngII (15-30 ng) ou d'AngIII (15 ng) augmente la fréquence et l'amplitude des décharges phasiques de ces neurones, traduisant une sécrétion accrue de vasopressine. A l'inverse, l'administration i.c.v de l'inhibiteur d'APA (EC33 10 µg) provoque un silence total des neurones vasopressinergiques pendant 4-6 min et inhibe l'augmentation d'activité phasique de ces neurones provoquée par l'AngII (30 ng). En conclusion, l'augmentation d'activité des neurones vasopressinergiques du SON induite par l'AngII, nécessite la conversion préalable de l'AngII en AngIII. Ces résultats sont en accord avec les données précédentes obtenues sur la sécrétion de vasopressine et suggèrent que l'AngIII serait responsable de l'activation des neurones vasopressinergiques du SON. De plus, dans certaines conditions physiopathologiques comme la déshydratation, l'AngIII endogène cérébrale exercerait un contrôle tonique de l'activité de ces neurones.

### ***3. L'effet des inhibiteurs d'APA sur la pression artérielle***

L'augmentation de pression artérielle induite par les angiotensines cérébrales résulte d'une diminution du tonus parasympathique due à l'inhibition de l'arc baroréflexe situé dans le noyau du tractus solitaire, d'une augmentation de l'activité orthosympathique par stimulation des neurones préganglionnaires et d'une augmentation de la sécrétion de vasopressine due à la stimulation des neurones magnocellulaires des noyaux supraoptique et paraventriculaire.

Il est bien établi que l'injection par voie i.c.v d'AngII ou d'AngIII induit une augmentation de la pression artérielle. Si l'AngIII est le peptide effecteur du SRA cérébral dans le contrôle de cette fonction comme dans le cas de la sécrétion de vasopressine, le blocage de l'APA devrait provoquer une chute de la pression artérielle.

Afin de tester cette hypothèse, l'AngII ou l'AngIII seront injectées par voie i.c.v chez le rat anesthésié ou vigile en absence ou en présence des inhibiteurs d'APA ou d'APN, et la pression artérielle (PA) ainsi que la fréquence cardiaque seront enregistrées après cathétérisme de l'artère fémorale. L'effet de ces inhibiteurs sera aussi étudié dans différents modèles expérimentaux d'hypertension artérielle (rat spontanément hypertendu, rat présentant une hypertension rénovasculaire, rat de Dahl sensibles au sel).

Les expériences réalisées avec l'inhibiteur d'APA (EC33) montrent que le prétraitement par cet inhibiteur 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 hypertendu que chez le rat normotendu. Ces données et d'autres en cours nous ont permis de déposer un brevet à l'INSERM intitulé : « Composition pharmaceutique utile pour diminuer la pression artérielle comprenant au moins un inhibiteur d'aminopeptidase A ».

Afin de préciser le mode d'action de l'AngIII sur la pression artérielle nous envisageons de tester les effets de ce peptide sur l'activation du baroréflexe. Cette

étude sera menée chez des rats normotendus et hypertendus vigiles. La courbe du baroréflexe [Rythme Cardiaque = f (Pression Artérielle)] se réalise classiquement en faisant varier la pression artérielle par une perfusion intraveineuse de phényléphrine (agoniste  $\alpha$ -adrénergique) qui induit une augmentation de pression artérielle sans effet chronotrope direct et d'autre part par une perfusion de nitroprussiate provoquant une vasodilatation (hypotension). Lors de ces expériences, la pression artérielle ainsi que les variations du rythme cardiaque seront enregistrées en continu. Nous étudierons les effets de l'injection par voie i.c.v d'AngII ou d'AngIII, en présence ou en l'absence d'inhibiteurs d'aminopeptidases A ou N, sur la réponse du baroréflexe artériel.

## 2. Récepteurs de l'angII/angIII de type-1 ( $AT_{1A}$ et $AT_{1B}$ ) et de type-2 ( $AT_2$ )

### A. Dans le cerveau et l'hypophyse : Identification du type cellulaire exprimant les récepteurs $AT_{1A}$ , et $AT_{1B}$ .

#### \* Dans le SNC

Après avoir établi une cartographie détaillée de la distribution des ARNm des récepteurs  $AT_{1A}$  et  $AT_{1B}$  dans le SNC et l'hypophyse, la seconde partie de l'étude a consisté à déterminer dans les noyaux paraventriculaires (PVN) et supraoptiques (SON), la localisation cellulaire (neuronale ou gliale) de l'ARNm du récepteur  $AT_{1A}$  et notamment sa présence dans les neurones magnocellulaires vasopressinergiques. A cet effet, un triple marquage a été effectué sur des coupes de cerveau de rat par hybridation *in situ* à l'aide d'une ribosonde radioactive spécifique de la séquence du récepteur  $AT_{1A}$  et d'une sonde oligonucléotidique marquée à la dioxycénine, spécifique de la séquence de la vasopressine, suivi d'une détection immunohistochimique d'un marqueur astrocytaire, la GFAP. Nos résultats indiquent que l'ARNm du récepteur  $AT_{1A}$  est principalement exprimé par les neurones de la partie parvocellulaire dorsale et médiale du PVN. A l'inverse, aucun marquage n'a pu être détecté dans les neurones vasopressinergiques magnocellulaires, aussi bien dans le PVN que dans le SON. Cependant, dans le PVN, quelques neurones magnocellulaires non vasopressinergiques expriment ce récepteur.

La localisation neuronale des récepteur  $AT_{1A}$  dans la partie parvocellulaire du PVN semble parallèle à celle des neurones à CRF et pourrait rendre compte de l'effet stimulateur des angiotensines sur la libération de CRF. L'absence de récepteurs  $AT_{1A}$  sur les neurones vasopressinergiques suggère une régulation indirecte de ces neurones via un autre neuromédiateur ou l'implication d'un type de récepteur de l'AngII encore inconnu.

#### \* Dans l'antéhypophyse

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

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

— Un double marquage du tissu hypophysaire en utilisant une ribosonde radioactive spécifique de la séquence du récepteur AT<sub>1B</sub> et un anticorps dirigé contre la prolactine ou l'ACTH.

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

Par le double marquage, nous avons précisé l'expression prédominante des récepteurs AT<sub>1B</sub> dans les cellules lactotropes et faiblement détectable dans les cellules corticotropes.

En conclusion, l'effet stimulateur de l'AngII hypophysaire, synthétisée dans les cellules gonadotropes, sur la sécrétion de prolactine et d'ACTH est un effet paracrine direct médié par les récepteurs AT<sub>1B</sub>. En outre, l'expression différentielle des deux sous-types de récepteurs de l'AngII, AT<sub>1A</sub> dans le SNC et AT<sub>1B</sub> dans l'antéhypophyse, pourrait rendre compte des actions opposées de l'AngII sur la sécrétion de prolactine aux niveaux hypothalamique et hypophysaire.

**B. A la périphérie : Rôle de la protéine kinase C (PKC) et de la tyrosine kinase (TK) sur les augmentations de calcium induites par l'AngIII et la bradykinine (BK) dans la branche large ascendante corticale de rein de rat (CTAL). Étude des interactions entre ces deux peptides**

Bien que le CTAL ne contienne qu'un seul type cellulaire, il est soumis à de multiples régulations hormonales. Nous avons précédemment montré que le CTAL exprime majoritairement les messagers du récepteur AT<sub>1A</sub> et que dans ce même segment, les réponses calciques induites par l'AngII et l'AngIII sont médiées par ce même sous-type de récepteur. Les principaux objectifs de notre étude étaient de caractériser dans le CTAL les réponses calciques induites par l'AngIII et la BK, les rôles possibles de la PKC et de la TK sur ces réponses et les interactions entre ces deux peptides. Les mesures de libération de calcium intracellulaire sont réalisées par microfluorimétrie, avec la sonde fura-2.

Les résultats obtenus avec 100 nM d'Ang III et 100 nM de BK sont les suivants : 1) La réponse calcique induite par la BK est médiée par un récepteur de type B<sub>2</sub> puisque elle est totalement abolie par un antagoniste des récepteurs B<sub>2</sub>. 2) Les réponses calciques induites par ces deux peptides ne sont pas additives. 3) Une préincubation de 20 minutes en présence de 1 µM de bisindolylmaléimide 1, un inhibiteur de PKC, potentialise les réponses calciques induites soit par l'AngIII [460 ± 71 nM (n = 10) versus 258 ± 28 nM (n = 10), p < 0.05], soit par la BK [587 ± 55 nM (n = 8) versus 363 ± 40 nM (n = 11), p < 0.01]. 4) Les augmentations de calcium induites par l'AngIII et la BK sont médiées par une

activité TK. En effet, une préincubation de 20 minutes en présence de 100  $\mu\text{M}$  de génistéine, un inhibiteur de TK, inhibe les réponses calciques induites par l'AngIII et par la BK de  $57 \pm 7$  et  $53 \pm 7$  % respectivement. En absence de calcium externe, des inhibitions similaires sont obtenues. De plus, les mesures correspondantes des surfaces calciques indiquent clairement que l'influx calcique est également partiellement médié par la voie de la TK. 5) Ces deux peptides sont soumis à un processus de désensibilisation homologue par un mécanisme PKC-indépendant : après une première exposition soit à l'AngIII, soit à la BK, les réponses calciques induites par une dose équimolaire du même peptide sont réduites de 80 et 100 % respectivement. 6) L'AngIII appliquée en première position n'entraîne pas de phénomène de désensibilisation hétérologue vis-à-vis de la BK ; en revanche, une première application de BK réduit la réponse calcique induite par l'AngIII de  $48 \pm 6$  %. Ce processus est PKC- et TK-indépendant.

En conclusion, dans le CTAL les réponses calciques induites par ces deux peptides a) sont dues à la libération d'un même pool intracellulaire, b) sont médiées par une activité PKC et c) pourraient résulter, au moins en partie, d'une activation de l'isoforme  $\text{PLC}_\gamma$ . De plus, les derniers résultats montrent que la BK pourrait dans ce segment jouer un rôle important en régulant les effets de l'AngII/AngIII.

## **VI. FONCTIONS MOLÉCULAIRES ET SIGNALISATION DES RÉCEPTEURS MEMBRANAIRES DES PEPTIDES VASOACTIFS ET DE L'INSULINE**

Équipe : E. CLAUSER, C. AUZAN, S. MISEREY, C. MONNOT, C. PARNOT

L'activité du groupe au cours de l'année 1997-98 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) Les récepteurs aux peptides vasoactifs**

Les récepteurs de l'AngII ( $\text{AT}_1$  humain,  $\text{AT}_{1A}$ , et  $\text{AT}_{1B}$  de rat,  $\text{AT}_2$  de rat), qui nous servent de modèle mais aussi de la vasopressine (V1a, V1b et V2) et de l'endotheline (ETA et ETB) sont des récepteurs heptatransmembranaires couplés à des protéines G, qui ont été clonés. Grâce aux ADNc de ces récepteurs (offerts ou reclés au laboratoire), nous avons étudié la pharmacologie moléculaire, les rapports structure-fonctions, les interactions protéiques et la signalisation de ces récepteurs par différentes approches.

\* La pharmacologie moléculaire d'un composé non peptidique agoniste des récepteurs AT<sub>1</sub> (L162 313) a été étudiée. Ce composé se fixe avec la même faible affinité (200 nM) aux récepteurs AT<sub>1A</sub>, AT<sub>1B</sub> et AT<sub>2</sub> et se comporte comme un agoniste partiel et un antagoniste partiel vis-à-vis du récepteur AT<sub>1</sub>. De plus sa liaison à une batterie de mutants du récepteur AT<sub>1A</sub>, 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, de la désensibilisation et du couplage du récepteur AT<sub>1A</sub> ont été plus spécifiquement étudiés par délétions progressives de la séquence carboxyterminale et des modifications de la 3<sup>e</sup> boucle intracellulaire de ce récepteur.

— Une séquence riche en sérines et thréonines de la partie médiane du segment carboxyterminal est essentielle pour l'internalisation et la désensibilisation du récepteur. La délétion de cette séquence n'empêche cependant pas le couplage aux protéines G et le mutant correspondant présente un phénotype hyperréactif avec une transmission amplifiée du signal, du fait de l'absence de désensibilisation et d'internalisation.

— Le remplacement du segment distal de la 3<sup>e</sup> boucle intracellulaire du récepteur AT<sub>1</sub> par les séquences homologues des récepteurs α1 et β2-adrénériques et du récepteur AT<sub>2</sub> a permis d'explorer le couplage du récepteur. Ces modifications n'entraînent pas d'activation constitutive du récepteur AT<sub>1</sub>, mais modifient son couplage aux protéines G : conservation du couplage avec Gq pour la chimère α1-adrénérique, suppression du couplage pour la chimère AT<sub>2</sub> 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 β2-adrénérique.

\* Enfin nous avons développé plusieurs modèles d'étiquetage du récepteur AT<sub>1A</sub> de rat en l'absence d'anticorps spécifiques contre cette protéine. La réalisation d'une protéine de fusion récepteur AT<sub>1A</sub>-EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein) permet l'expression d'un récepteur fonctionnel, facilement identifiable par Western blot, immunoprécipitation et histochimie.

\* De plus ces récepteurs étiquetés fonctionnels vont nous permettre de développer nos travaux de recherche dans 3 directions complémentaires :

— l'étude directe de la dimérisation homologue et hétérologue du récepteur AT<sub>1</sub> ;

— l'étude des voies de signalisation du récepteur AT<sub>1</sub> dans différentes cellules cibles de l'AngII ;

— l'analyse des interactions protéine-protéine mises en évidence par co-immunoprécipitation entre le récepteur AT<sub>1</sub> et d'autres protéines de signalisation ainsi qu'avec les protéine kinases impliquées dans la désensibilisation homologue et hétérologue.

\* Ces travaux en cours sont complétés par :

— le clonage par double hybride de nouvelles protéines interagissant avec les segments intracellulaires du récepteur AT<sub>1</sub>. La technique double hybride est actuellement mise au point.

— le clonage d'une banque mutationnelle du récepteur AT<sub>1</sub> par un test fonctionnel recherchant une activation constitutive du récepteur AT<sub>1</sub>.

Certains aspects de ces travaux (dimérisation, interactions protéiques et activation constitutive) seront étendus à d'autres récepteurs, comme ceux de la vasopressine clonés au laboratoire.

## **B) 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 (CR1 CNRS, Laboratoire de J. GIRARD à Meudon) nous avons étudié le rôle fonctionnel d'une protéine appelée Grb15 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 elle est elle-même phosphorylée par le récepteur de l'insuline. Fonctionnellement Grb15 inhibe la transmission des effets mitogéniques de l'insuline.

## **VII. GÉNÉTIQUE MOLÉCULAIRE DE L'HYPERTENSION ARTÉRIELLE HUMAINE**

Équipe : X. JEUNEMAITRE, A.-M. HOUOT, A.-P. GIMENEZ-ROQUEPLO, J. CÉLÉRIER, M. GIACCHÉ, S. DISSE, P.-F. PLOUIN

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

Le but de ce projet est l'étude approfondie biochimique des variants moléculaires du gène de l'angiotensinogène identifiés chez l'homme et leur association

avec différentes formes d'hypertension artérielle. Des associations supplémentaires ont pu être observées en particulier dans la néphropathie diabétique en interaction avec le polymorphisme de l'enzyme de conversion de l'AngII. Une recherche approfondie de polymorphismes de la région promotrice a été entreprise afin de détecter un variant fonctionnel, en déséquilibre avec le polymorphisme M235T lui-même associé une élévation de l'ordre de 20 % de la concentration plasmatique de la protéine. L'analyse 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.

L'étude biochimique de la protéine a été entreprise avec l'expression *in vitro* en cellules eucaryotes d'angiotensinogène muté pour les différents sites de glycosylation. Cette étude nous a permis de montrer l'implication du site N<sup>14</sup> dans la cinétique de la réaction enzymatique avec la rénine, la glycosylation de chaque site à l'origine de l'hétérogénéité de la protéine en migration SDS-PAGE, la possibilité d'obtenir un angiotensinogène recombinant totalement déglycosylé. L'étude des ponts disulfures impliqués dans la structure de la protéine native et/ou de la forme de haut poids moléculaire de l'angiotensinogène est en cours. Les procédés de purification de l'angiotensinogène recombinant ont été mis au point ainsi que sa production à large échelle dans le cadre d'un projet de cristallisation de la protéine en collaboration avec les laboratoires Hoffmann-Laroche.

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

La présence de mutations de la partie C-terminale des sous-unités  $\beta$  et  $\gamma$  de ce canal dans la maladie de Liddle — qui associe une HTA précoce et sévère à transmission autosomique dominante et un profil biologique très particulier (perte potassique, rénine et aldostérone basses) — a pu être confirmée par notre étude d'une première famille européenne. Dans cette pathologie, nous avons initié une collaboration avec le groupe de G.A. 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 qui montrent une augmentation nette de la différence de potentiel mesurable à ce niveau, suggèrent que cette mesure pourrait constituer un test diagnostique complémentaire intéressant de la maladie.

L'hypothèse de l'existence possible de mutations moins sévères de ce canal dans l'HTA essentielle, en particulier en cas de rénine basse a été testée sur plus de 500 sujets hypertendus et 300 témoins. Après avoir déterminé l'organisation de la structure génomique des sous-unités  $\beta$  et  $\gamma$ , une recherche systématique de mutations nous a permis d'identifier cinq mutations faux-sens sur la sous-unité  $\beta$  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. La mesure fonctionnelle de cette mutation (P. BARBRY, Sophia Antipolis) par expression en œufs de xénopes et patch-clamp, n'a montré qu'une

élévation très modeste du courant  $\text{Na}^+$  sensible à l'amiloride pour chacune des mutations étudiées. Cependant, l'étude de la fréquence du polymorphisme T574M de  $\beta\text{ENaC}$  suggère un rôle possible de ces variations dans l'hypertension artérielle.

### **C. Étude du gène de la $11\beta\text{OHase}$ et de l'aldostérone synthase**

L'HTA suppressible par la Dexaméthasone est la conséquence d'une recombinaison inégale des gènes  $\text{CYP11B1}$  et  $\text{CYP11B2}$ . Une étude moléculaire de ces deux gènes nous a permis de montrer le rôle important de deux acides aminés dans la spécificité de chaque enzyme. La recherche d'un lien entre ce locus du chromosome 8 et l'HTA essentielle a été négative bien qu'un polymorphisme situé en position -344 pourrait être associé à la concentration d'aldostérone plasmatique circulante.

### **D. Étude de nouveaux gènes candidats et de phénotypes intermédiaires**

L'étude phénotypique détaillée de paires de germains hypertendus entreprise depuis 1994 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 (système rénine angiotensine, système kalicréine-kinine, réponse au sel, sécrétion d'aldostérone, contre-transport  $\text{Na}/\text{Li}$ ).

Nous avons pu montrer des relations familiales positives sur la concentration plasmatique de rénine dans des conditions standardisées de régime salé ainsi que sur la réponse de la sécrétion d'aldostérone à la perfusion d'angiotensine II, et de l'excrétion de cortisol urinaire. D'autres phénotypes dont l'héritabilité a été suggérée dans la littérature vont être étudiés : baisse tensionnelle sous déplétion sodée, syndrome d'hypertension et dyslipidémie, hypertension et insulino-résistance. Des relations génotype-phénotype sont effectuées pour chacun des gènes codant pour les phénotypes intermédiaires correspondants.

### **E. Recherche de nouveaux loci impliqués dans l'HTA essentielle**

Une première tentative de localisation des gènes impliqués dans l'HTA essentielle a été effectuée en collaboration avec le groupe du Pr SOUBRIER (Inserm U258) et le groupe du Pr M. LATHROP à Oxford (Wellcome Trust). Une localisation sur le chromosome 17 proche du gène de l'hormone de croissance a été obtenue et représente la première identification d'un locus commun entre un modèle animal expérimental (rat spontanément hypertendu et l'homme). Nous souhaitons poursuivre cette approche en 1) densifiant les marqueurs dans les zones d'intérêt, 2) analysant des familles supplémentaires, 3) utilisant de nouveaux moyens techniques (puces à ADN) et en développant de nouvelles collaborations internationales.

## F. Génétique d'autres maladies cardiovasculaires

La dysplasie fibromusculaire (DFM) est une artériopathie systémique d'origine inconnue, à prédominance féminine, touchant les artères musculaires de moyen calibre en particulier les atteintes rénales et cérébrales. Nous avons effectué en 1995-6 un effort systématique d'évaluation familiale de la DFM à partir de plus de 100 patients atteints de DFM et avons identifié environ 10 % de cas familiaux. Des premières études moléculaires n'ont pas permis de mettre en évidence une relation avec certains gènes de la matrice vasculaire (COL3A1, Elastine). Nous poursuivons l'analyse de cette pathologie avec en particulier la recherche d'une amélioration de la caractérisation phénotypique de l'atteinte vasculaire — des résultats prometteurs ont été obtenus par échographie de haute résolution en collaboration avec l'unité 337 (S. LAURENT, P. BOUTOUYRIE).

Nous avons aussi débuté depuis 3 ans (projet PHRC-94) la collection de familles atteintes de prolapsus valvulaire mitral idiopathique (maladie de Barlow). Cette pathologie, touchant environ 5 % de la population adulte est le plus souvent bénigne mais peut se compliquer d'insuffisance mitrale, d'endocardite, de troubles du rythme cardiaque et plus rarement de mort subite. Nous disposons actuellement de plusieurs familles suffisamment larges pour conduire à une localisation primaire de la maladie par analyse de liaison génétique.

## G. Études cliniques dans l'HTA secondaire

L'approche de l'HTA rénovasculaire a été multiple, portant sur la quantification des sténoses de l'artère rénale (SAR), l'évaluation diagnostique du Doppler avec contraste, l'évaluation de la dilatation endoluminale des SAR dans le cadre d'un essai coopératif randomisé (EMMA). Celui-ci a montré que, dans l'athérome, la dilatation permettait de réduire l'intensité du traitement mais non d'abaisser la pression artérielle ou a fortiori de guérir l'HTA (normotension sans traitement).

Un certain nombre de travaux portant sur les tumeurs de la surrenale ont été effectués dans le cadre du réseau Inserm COMETE. Pour les tumeurs sécrétant des glucocorticoïdes, le réseau a montré l'association avec le phénotype malin d'anomalies de la région 11p15 et d'une surexpression d'IGF-II. Pour les tumeurs sécrétant de l'aldostérone, nous avons optimisé les tests diagnostiques de l'hyperaldostéronisme primaire et analysé dans ce syndrome la réponse *in vivo* à la perfusion de potassium et d'angiotensine III.

Dans les phéochromocytomes, nous avons étudié à long terme (796 patient-années) la probabilité de récurrence chez des patients opérés d'un phéochromocytome initialement bénin. L'incidence des récurrences (bénignes ou malignes) était de 20 %, les prédicteurs indépendants de récurrence étant la présence d'une maladie familiale et un profil « immature » de sécrétion de catécholamines. L'étude de la tumeur nous a permis d'établir la présence de mutations somatiques de *RET* dans certains phéochromocytomes sporadiques. Cette étude est poursuivie dans le

réseau COMETE par l'analyse du système RET/GDNFet dans le cadre du RET International Consortium par une étude génotype/phénotype. L'examen des tumeurs nous a également permis d'étudier la densité et le type des récepteurs à la somatostatine dans les phéochromocytomes bénins, ectopiques et malins et d'analyser in vivo la réponse sécrétoire à l'octréotide, un agoniste de ces récepteurs.

## BIBLIOGRAPHIE

1997

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

DAVIES E., BONNARDEAUX A., PLOUIN P.F., CORVOL P. and CLAUSER E. Somatic mutations of the angiotensin II (AT(1)) receptor gene are not present in aldosterone-producing adenoma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82 : 611-615, 1997.

JEUNEMAITRE X., LEDRU F., BATTAGLIA S., GUILLANNEUF M.-T., COURBON D., DUMONT C., DARMON C., GUIZE L., GUERMONPREZ J.-L., DIEBOLD B. and DUCIMETIÈRE 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.

MULLER L., BARRET A., PICART R. and TOUGARD C. Proteolytic processing of sulfated secretogranin II in the trans-Golgi network of GH3B6 prolactin cells. *J. Biol. Chem.* 272 : 3669-3673, 1997.

MORINEAU G., PASCOE L., MARC J.-M., CAILLETTE A., KROZOWSKI Z., CORVOL P. and FIET J. Un cas d'excès apparent de minéralocorticoïdes par déficit en 11 $\beta$ -hydroxystéroïde-déshydrogénase de type 2. *Arch. Mal. Cœur* 90 : 1111-1115, 1997.

CONCHON S., BARRAULT M.-B., MISEREY S., CORVOL P. and CLAUSER E. The C-terminal third intracellular loop of the rat AT<sub>1A</sub> angiotensin II receptor plays a key role in G protein coupling specificity and transduction of the mitogenic signal. *J. Biol. Chem.* 272 : 25566-25572, 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.

GERMAIN S., KONOSHITA T., FUCHS S., PHILIPPE J., CORVOL P. and PINET F. Regulation of human renin gene transcription by cAMP. *Clin. Exp. Hypertens.* 19 : 543-550, 1997a.

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, 1997b.

PARNOT C., LEMOULLEC J.-M., COUSIN M.-A., GUEDIN D., CORVOL P. and PINET F. A live-cell assay for studying extracellular and intracellular endothelin-converting enzyme activity. *Hypertension* 30 : 837-844, 1997.

KORTH P., EGIDY G., PARNOT C., LEMOULLEC J.-M., CORVOL P. and PINET F. Construction and characterization of a soluble form of human endothelin-converting enzyme-1. *FEBS Lett.* 417 : 365-370, 1997.

WILLIAM 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.

MICHAUD A., WILLIAMS T.-A., CHAUVET M.-T. and CORVOL P. Substrate dependence of Angiotensin I-converting enzyme inhibition : captopril displays a partial selectivity for inhibition of N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline hydrolysis compared with that of angiotensin I. *Mol. Pharmacol.* 51 : 1070-1076, 1997.

ESTHER Jr C.R., MARINO E.M., HOWARD T.E., MICHAUD A., CORVOL P., CAPECCHI M.R. and BERNSTEIN K.E. The critical role of tissue Angiotensin-converting enzyme as revealed by gene targeting in mice. *J. Clin. Invest.* 99 : 2375-2385, 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.

BOUBY N., HUS-CITHAREL A., MARCHETTI J., BANKIR L., CORVOL P. and LLORENS-CORTES C. Expression of type 1 angiotensin II receptor subtypes and angiotensin II-induced calcium mobilization along the rat nephron. *J. Am. Soc. Nephrol.* 8 : 1658-1667, 1997.

LENKEI Z., PALKOVITS M., CORVOL P. and LLORENS-CORTES C. Expression of angiotensin type-1 (AT1) and type-2 (AT2) receptor mRNAs in the adult rat brain : a functional neuroanatomical review. *Front. Neuroendocrinol.* 18 : 383-439, 1997.

VAZEUX G., ITURRIOZ X., CORVOL P. and LLORENS-CORTES C. A tyrosine residue essential for catalytic activity in aminopeptidase A. *Biochem. J.* 327 : 883-889, 1997.

MOREAU C., RASOLOJANAHARY R., ZAMORA A.J., ENJALBERT A., KORDON C. and LLORENS-CORTES C. Expression of angiotensin II receptor subtypes AT(1A) and AT(1B) in enriched fractions of dispersed rat pituitary cells. *Neuroendocrinology* 66(6) : 416-425, 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, 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 JM. 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., ALHENC-GELAS F. and 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.

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

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.

JEUNEMAITRE X., INOUE I., WILLIAMS C.S., TICHET J., CHARRU A., DUMONT C., HATA A., GIMENEZ-ROQUEPLO A.-P., SHARMA A., CORVOL P. and LALOUEL J.-M. Haplotypes of the angiotensinogen gene in human essential hypertension. *Am. J. Hum. Genet.* 60 : 1448-1460, 1997.

JEUNEMAITRE X., BASSILANA F., PERSU A., DUMONT C., CHAMPIGNY G., LAZDUNSKI M., CORVOL P. and BARBRY P. Genotype-phenotype analysis of a new family with Liddle syndrome. *J. Hypertens.* 1 : 1091-1100, 1997.

CORVOL P. and JEUNEMAITRE X. Molecular genetics of human hypertension : role of angiotensinogen. *Endocr. Rev.* 18 : 662-677, 1997.

JULIER C., DELEPINE M., KEAVNEY B., TERWILLIGER J., DAVIS S., WEEKS E., BUI T., JEUNEMAITRE X., VELHO G., FROGUEL P., RATCLIFFE P., CORVOL P., SOUBRIER F. and LATHROP G.M. Genetic susceptibility for human familial essential hypertension in a region of homology with blood pressure linkage on rat chromosome 10. *Hum. Mol. Genet.* 6 : 2077-2085, 1997.

PEDERSEN O.D., GRAM J., JEUNEMAITRE X., BILLAUD E. and JESPERSEN J. Does long-term angiotensin converting enzyme inhibition affect the t-PA/PAI blood concentration in the blood of patients with a previous myocardial infarction. *Coron. Artery Dis.* 8 : 283-291, 1997.

PANNIER-MOREAU I., GRIMBERT P., FIQUET-KEMPF B., VUAGNAT A., JEUNEMAITRE X., CORVOL P. and PLOUIN P.-F. Possible familial origin of multifocal renal artery fibromuscular dysplasia. *J. Hypertens.* 15 : 171997-1801, 1997.

PLOUIN P.-F., CLAUDON M., ROHBAN T. and on behalf of the Levovist Renal Artery Study Group. Echo-enhanced renal Doppler imaging with Levovist (SHU 508A) : results of a controlled multicentre study. *J Hypertens.* 15 (suppl 4) : S22, 1997.

GICQUEL C., RAFFIN-SANSON M.L., GASTON V., BERTAGNA X., PLOUIN P.-F., SCHLUMBERGER M., LOUVEL A., LUTON J.-P. and LE BOUC Y. Structural and functional abnormalities at 11p15 are associated with the malignant phenotype in sporadic adrenocortical tumors : study on a series of 82 tumors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82 : 2559-2565, 1997.

PLOUIN P.-F., CHATELLIER G., FOFOL I. and CORVOL P. Tumor recurrence and hypertension persistence after successful pheochromocytoma operation. *Hypertension* 29 : 1133-1139, 1997.

ZABERNIGG A., MÜLLER-HOLZNER E., GASC J.-M. and GATTRINGER C. An unusual case of a renin-producing tumour of the fallopian tube. *Eur. J. Cancer* 33 : 1709, 1997.

CHERRAK I., PAUL J.-F., JAULENT M.-C., CHATELLIER G., PLOUIN P.-F., GAUX J.-C. and DEGOULET P. Automatic stenosis detection and quantification in renal arteriography. *Proc. AMIA Ann. Fall. Symp.* 9 : 66-70, 1997.

## 1998

ISAAC R.E., WILLIAMS T.-A., SAJID M., CORVOL P. and COATES D. Cleavage of arginyl-arginine and lysyl-arginine from the C-terminus of pro-hormone peptides by human germinal angiotensin I-converting enzyme (ACE) and the C-domain of human somatic ACE. *Biochem J.* 328 : 587-591, 1998.

ISAAC R.E., SCHOofs L., WILLIAMS T.-A., VEELAERT D., SAJID M., CORVOL P. and COATES D. A novel peptide-processing activity of insect peptidyl-dipeptidase A (angiotensin I-converting enzyme) : the hydrolysis of lysyl-arginine from the carboxy terminus of an insect pro-hormone peptide. *Biochem. J.* 330 : 61-65, 1998.

LENKEI Z., PALKOVITS M., CORVOL P. and LLORENS-CORTES C. Distribution of angiotensin type-1 receptor (AT1) mRNA expression in the adult rat brain. *Neuroscience* 82 : 827-841, 1998.

TIRET L., BLANC H., RUIDAVETS J.-B., ARVEILER D., LUC G., JEUNEMAITRE X., TICHET J., MALLET C., POIRIER O., PLOUIN P.-F. and CAMBIEN F. Gene polymorphisms of the renin angiotensin system in relation to hypertension and parental history of coronary heart disease and stroke. The PEGASE Study. *J. Hypertens.* 16 : 31-36, 1998.

LITCHFIELD W.R., HUNT S.C., JEUNEMAITRE X., FISHER N.D., HOPKINS P.N., WILLIAMS R.R., CORVOL P. and WILLIAMS GH. Increased urinary free cortisol : a potential intermediate phenotype of essential hypertension. *Hypertension* 31 : 569-574, 1998.

PLOUIN P.-F., CHATELLIER G., DARNÉ B., RAYNAUD A. for the EMMA Study Group. Blood pressure outcome of angioplasty in atherosclerotic renal artery stenosis : a randomized trial. *Hypertension* 31 : 823-829, 1998.

MULLER L., PICART R., BARRET A., SEIDAH N.G. and TOUGARD C. Immunocytochemical localization of the prohormone convertases PC1 and PC2 in rat prolactin cells. *J. Histochem. Cytochem.* 46 : 101-108, 1998.

BALOGH A., CADEL S., FOULON T., PICART R., DER GARABEDIAN A., ROUSSELET A., TOUGARD C. and COHEN P. Aminopeptidase B : a processing enzyme secreted and associated with the plasma membrane of rat pheochromocytoma (PC12) cells. *J. Cell Sci.* 111 : 161-169, 1998.

VILA-PORCILE E. and CORVOL P. Angiotensinogen, prorenin, and renin are co-localized in the secretory granules of all glandular cells of the rat anterior pituitary : an immuno-ultrastructural study. *J. Histochem. Cytochem.* 46 : 301-311, 1998.

SABERAN-DJONEIDI D., PICART R., ESCALIER D., GELMAN M., BARRET A., TOUGARD C., GLOWINSKI J. and LEVI-STRAUSS M. A 21-kDa polypeptide belonging to a new family of proteins is expressed in the Golgi apparatus of neural and germ cells. *J. Biol. Chem.* 273 : 3909-3914, 1998.

HAGAMAN J. R., MOYER J. S., BACHMAN E. S., SIBONY M., MAGYAR P. L., WELCH J.E., SMITHIES O., KREGG J.H. and O'BRIEN D.A. Angiotensin-converting enzyme and male fertility. *Proc. natl. Acad. Sci. USA* 95 : 2552-2557, 1998.

CONCHON S., PELTIER N., CORVOL P. and CLAUSER E. A noninternalized non-desensitized truncated AT<sub>1A</sub> receptor transduces an amplified ANG II signal. *Am. J. Physiol.* 274 : E336-E345, 1998.

VIANELLO B., CLAUSER E., CORVOL P. and MONNOT C. Functional interactions of the L162,313 with angiotensin II receptor subtypes and mutants. *Eur. J. Pharmacol.* 347 : 113-118, 1998.

BRAND M., LE MOULLEC J.-M., CORVOL P. and GASC J.-M. Ontogeny of endothelins-1 and -3, their receptors, and endothelin converting enzyme-1 in the early human embryo. *J. Clin. Invest.* 101 : 549-559, 1998.

CORVOL P. and JEUNEMAITRE X. Genetics of Hypertension. In : *Textbook of Cardiovascular Medicine*. E.J. Topol Ed. ; Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, pp. 2415-2428, 1998.

FEINGOLD J. and JEUNEMAITRE X. Génétique des maladies communes. In : *Principes de Génétique Humaine* — J. Feingold, M. Fellous, M. Solignac Eds., Hermann Editeurs des Sciences et des Arts — pp. 305-320, 1998.

BAKER E. H., DOGN Y. B., SAGNELLA G. A., ROTHWELL M., ONIPINLA A. K., MARKANDU N. D., CAPUCCIO F. P., COOK D. G., PERSU A., CORVOL P., JEUNEMAITRE X., CARTER N. D. and MACGREGOR G. A. Association of hypertension with T594M mutation in beta subunit of epithelial sodium channel in black people resident in London. *Lancet* 351 : 1388-1392, 1998.

ZINI S., DEMASSAY Y., FOURNIÉ-ZALUSKI M.-C., BISCHOFF L., CORVOL P., LLORENS-CORTÈS C. and SANDERSON P. Inhibition of vasopressinergic neurons by central injection of a specific aminopeptidase A inhibitor. *Neuroreport* 9 : 825-828, 1998.

HEYMES C., SYLVESTRE J.S., LLORENS-CORTES C., CHEVALIER B., MAROTTE F., LEVY B., SWYNGHEDAUF B. and SAMUEL J.-L. Cardiac senescence is associated with enhanced expression of angiotensin II receptor subtypes. *Endocrinology* 139 : 2579-2587, 1998.

#### EXPOSÉS, CONGRÈS

**Monsieur Pierre Corvol** a participé aux congrès suivants : Symposium Rénine — Septembre 97 — Uppsala — Suède ; Journées de l'Hypertension Artérielle — Décembre 1997 — Paris ; Société de Cardiologie — Janvier 1998 — Paris ; American Society of Hypertension — Janvier 98 — New York — USA ; International Society of Hypertension — Juin 1998 — Amsterdam.

**Monsieur Jean-Marie Gasc** et Hervé Kempf ont participé aux congrès suivants : Conférence de l'American Association for Cancer Research sur « Angiogenesis and Cancer » (Orlando, Florida ; 24-28 Janvier 1998) ; Conférence Philippe Laudat sur la « Biologie et Physiopathologie de l'Angiognénèse » (Aix les Bains ; 21-25 Septembre 1997) ; Congrès annuel de la Société Française de Biologie du Développement (Dourdan ; 29-31 Mai 1997) ; Société Française d'Endocrinologie (Paris ; 8-11 Octobre 1997) ; Troisième Séminaire International sur « Hirschsprung Disease and related Neurocristopathies » (Evian ; 5-8 Février 1998).

**Mademoiselle Judith Favier** (présentation orale) a participé à la Troisième réunion du Réseau Français d'Angiognénèse (Toulouse 23-24 Avril 1998).

**Mademoiselle Florence Pinet et son équipe** ont participé aux congrès suivants : 22nd European symposium on Hormones and Cell regulation — Mont-Saint-Odile (3-6 Octobre 1997) ; European Research Conference on Blood Pressure and Cardiovascular Disease — Noordwijkkerout, Hollande (18-20 Octobre 1997) ; Gordon Conference on angiotensin — Ventura, USA (15-19 Février 1998) ; Keystone Symposia, Angiogenesis and Vascular remodelling — Steamboat Springs, USA (28 Mars-4 Avril 1998) ; Congrès Biologie et Pathologie du cœur et des vaisseaux — Lille (28-29 Avril 98) ; 80th Endocrine Society Meeting — New Orleans, USA (24-27 Juin 1998). Monsieur Stéphane Germain a séjourné 2 mois à la Harvard School of Public Health (Harvard, Boston).

**Madame Claude Tougard** a participé aux congrès suivants : Conférence Lilly 1997 : « Endothélium : cible et acteur de Pathologies », Paris, 21 octobre 1997 ; Fondation René Touraine : « La cellule endothéliale », Paris, 17 novembre 1997 ; Colloque Annuel de la Société Française de Biologie Cellulaire, « Dynamique et

organisation des compartiments cellulaires », Paris, 8-10 mars 1998 ; Séminaire au Club de Microscopie Electronique de l'Institut Curie, Paris, 14 octobre 1997.

**Madame Evelyne Vila-Porcile** a participé aux congrès suivants : Société de Biologie, Journée Claude Bernard, Paris, 20 novembre 1997 ; Conférence Lilly : « Endothélium : cible et acteur de pathologies », Paris, 21 octobre 1997 ; Colloque Annuel de la Société Française de Biologie Cellulaire, « Dynamique et organisation des compartiments cellulaires », Paris, 8-10 mars 1998.

**Madame Catherine Llorens-Cortes** et son équipe ont participé aux congrès suivants : The American Pediatric Society / The Society for Pediatric Research — Washington (USA) — 1-4 Mai 1997 ; 27th Annual Meeting of Society for Neuroscience — New Orleans (USA) — 25 au 30 Octobre 1997 ; The American Society of Nephrology (ASN), 30th annual meeting, New Orleans, Louisiana (USA), 2-5 Novembre 1997 ; Séance de la Société de Biologie — Paris (France) — 18 Février 1998.

**Séminaires donnés sur invitation En France** : INSERM U64 (R. Ardaillou) Paris — Oct. 97 ; Laboratoire de pharmacologie, Faculté de Médecine (B. Iouzolen) — Dec. 1997 ; INSERM U297 (F. Hery) Marseille — Fev. 98.

**A l'étranger** : Institut de recherches cliniques de Montréal — Lab. de neurobiologie et des peptides vasoactifs — Montréal — Canada — Sept. 97 ; Université de Sherbrooke — Département d'endocrinologie (N. Gallo-Payet) — Sherbrooke — Canada — Sept. 97 ; Cardiology Division — UCSD Medical Center (B. Greenberg) — San Diego — USA — Oct. 97.

**Monsieur Xavier Jeunemaitre** et son équipe ont participé aux congrès suivants : VIIth European Meeting on Hypertension. Milan (Italy) — June 1997 ; Journées de la Société Française d'HTA, Paris, Décembre 1997 ; 17th Meeting of the International Society of Hypertension. Amsterdam (Netherlands) — June 1998.

#### ENSEIGNEMENTS

**Mademoiselle Florence Pinet** fait partie du comité de DEA de Biologie et Pharmacologie de l'Hémostase et des Vaisseaux et a participé à son enseignement. Elle fait partie du conseil d'administration du Groupe de Réflexion sur la Recherche Cardio-vasculaire : GRRC.

**Madame Claude Tougard** a participé aux enseignements de DEA suivants : DEA de « Biologie Cellulaire et Moléculaire » (Cours et encadrement du séminaire d'un étudiant), Paris VI, Mars 1998 ; DEA d'Endocrinologie et Interactions Cellulaires« (Séminaire méthodologique et encadrement de séminaires d'étudiants), Paris XI, Mai 1998. Cours dans le cadre du Certificat de Cytologie et Histologie. Université René Descartes. Février 1998.

**Madame Catherine Llorens-Cortes** a participé à l'enseignement de : i) Pharmacologie Endocrinienne (Paris VII) : C2 pour la Maîtrise des Sciences Biolo-

giques 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).

— Participation à l'enseignement au Forum des Jeunes Chercheurs et à la Société de Biologie.

— Participation au Jury de DEA de Neurosciences Paris VI, Paris XI.

**Monsieur Eric 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) ; Coresponsable 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 : Responsable de l'enseignement de Génétique à l'Université Paris VI (PCEM1, DCEM1), participation au module optionnel (Incidence de la génétique en pathologie) organisé à l'Hôpital Pitié-Salpêtrière pour les DCEM1, (Pr Brice), au Certificat C2 de Biochimie Génétique organisé par le Pr Ansellem (CHU Créteil-Henri Mondor), au Certificat C2 de Biologie Moléculaire (Paris V), organisé par le Pr Kaplan, au Certificat d'Endocrinologie Moléculaire organisé par le Pr Sultan (Montpellier), au DEA de Pharmacologie cardiovasculaire organisé par les Pr Safar et Sassard.

Communication et participation à l'enseignement de l'École Européenne d'Hypertension Artérielle, Paris 1997 (Pr Swales, Pr Ménard).

#### LISTE DES DIPLÔMÉS

##### DEA

Annabelle Réaux : DEA de Neurosciences (Paris XII). *Rôles respectifs de l'angiotensine II et de l'angiotensine III dans le contrôle central de la pression artérielle.*

Stéphanie Miserey : DEA de Physiopathologie Cellulaire et Moléculaire (Paris VI). *AT<sub>1A</sub>-EGFP un récepteur de l'angiotensine II autofluorescent.*

Fabrice Bonnet : DEA de Physiopathologie Cellulaire et Moléculaire (Paris VI). *Étude des éléments cis impliqués dans la spécificité d'expression du gène humain de la rénine : Rôle du premier intron et des éléments distaux du promoteur.*

Xavier Houard : DEA d'Endocrinologie et Interactions Cellulaires (Paris XI). *Homologues de l'enzyme de conversion de l'angiotensine I des mammifères chez Drosophila Melanogaster : ACER et AnCE. Caractérisation d'ACER et profil d'expression d'ACER et d'AnCE durant le développement de la nymphe.*

Charlotte LINARES : DEA de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire. *Récepteurs des endothélines de poulet : Pharmacologie et rôle dans le développement embryonnaire.*

#### THÈSE

Gilles Vazeux — Thèse de Doctorat de l'Université Paris XI — Soutenue le 11 Juin 1997. *Caractérisation du site actif de l'aminopeptidase A.*

Zsolt Lenkei — Thèse de Doctorat de l'Université Paris VI — Spécialité Neurosciences — Soutenue le 21 Janvier 1998. *Expression des ARNs messagers des récepteurs de l'angiotensine II dans le cerveau et l'hypophyse de rat adulte.*

Mathilde Sibony — Thèse de Doctorat de l'Université Paris VI — Spécialité : Physiopathologie Cellulaire et Moléculaire — Soutenue le 8 Décembre 1997. *Localisation histologique des deux isoformes de l'enzyme de conversion de l'angiotensine I : Contribution à l'étude du rôle spécifique de l'isoforme testiculaire dans la fertilité mâle.*