

## Médecine expérimentale

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

### MODELAGE ET REMODELAGE VASCULAIRE

Le cours de la Chaire de Médecine Expérimentale a poursuivi cette année l'enseignement de l'année précédente sur le « Modelage et le Remodelage Vasculaire ». Après un bref rappel sur les facteurs essentiels impliqués dans le développement vasculaire au cours de l'embryogénèse, le cours s'est attaché à l'étude des réponses de l'organisme à l'hypoxie. L'hypoxie joue, en effet, un rôle déterminant dans l'initiation des processus de vasculogénèse et d'angiogénèse. On peut même penser que, téléologiquement, elle est en grande partie le *primum movens* du développement des conduits apportant l'oxygène à tous les tissus de l'organisme. Les mécanismes moléculaires mis en jeu par l'hypoxie sont conservés tout au long du phylum animal. Ainsi, les facteurs transcriptionnels responsables de la formation de l'arbre trachéal chez la drosophile ont leur équivalent dans les cellules élaborant les vaisseaux chez les mammifères.

L'hypoxie peut être liée à une baisse de la pression partielle de l'oxygène dans l'air ambiant (haute altitude), à une diminution des échanges gazeux au niveau pulmonaire (pneumopathie), à une insuffisance du transport de l'oxygène (anémie), à une insuffisance cardiaque (cardiopathie), au développement rapide d'une tumeur (cancer). L'hypoxie entraîne une série de réponses systémiques et locales : accélération du débit cardiaque, vasodilatation, hyperventilation et production accrue d'érythrocytes grâce à la synthèse d'érythropoïétine ; au plan cellulaire, l'hypoxie transforme la phosphorylation oxydative aérobie en un métabolisme anaérobie avec expression sélective de gènes de la glycolyse, de la gluconogénèse, du transport du glucose. Une grande partie de ces réponses cellulaires sont coordonnées par un facteur transcriptionnel inductible par l'hypoxie, Hypoxia Inducible Factor-1 alpha (HIF-1 $\alpha$ ). HIF-1 $\alpha$  contrôle à son tour la transcription de gènes tels que l'érythropoïétine, le Vascular Endothelium Growth Factor (VEGF), différents gènes de la glycolyse. HIF-1 $\alpha$  fait partie de la famille des facteurs de transcription de type basic helix-loop-helix (bHLH). Il agit en s'hé-

térodimérisant avec un autre facteur transcriptionnel de type bHLH, HIF- $\beta$ , encore appelé Arylhydrocarbène Receptor Nuclear Translocator (ARNT), facteur ubiquitaire, présent au niveau du noyau. HIF-1 $\alpha$  est aussi exprimé de façon ubiquitaire et est induit lors de l'hypoxie par un mécanisme transcriptionnel et post-transcriptionnel. La partie C-terminale de la protéine comporte un domaine sensible à l'oxygène qui, dans des conditions de normoxie, est rapidement ubiquitinyllée et dégradée dans le protéasome. Lorsqu'existe une hypoxie, même modérée, ce domaine est stabilisé, HIF-1 $\alpha$  s'élève et s'hétérodimérise avec ARNT. D'autres types d'hétérodimères peuvent se créer, ainsi ARNT est capable d'interagir avec d'autres membres de la famille des bHLH comme le récepteur arylhydrocarbène (AHR), récepteur qui lie les xénobiotiques. Le complexe ainsi formé interagit avec les régions régulatrices de divers gènes modifiant l'activité du métabolisme cellulaire.

L'inactivation d'ARNT chez la souris par recombinaison homologue provoque une létalité à 10 jours et demi de vie embryonnaire, une désorganisation des vaisseaux, une raréfaction capillaire et une diminution des cellules musculaires lisses vasculaires péricapillaires. Les cellules souches embryonnaires (ES) dépourvues d'ARNT sont incapables d'augmenter *in vitro* l'expression des gènes de la glycolyse et le VEGF lors de l'hypoxie. L'inactivation du gène HIF-1 $\alpha$  entraîne une létalité au huitième jour de vie embryonnaire avec des anomalies vasculaires et du développement (absence de progression normale des vaisseaux céphaliques, de l'aorte et du sac vitellin, hypoplasie des arcs branchiaux, absence de fermeture du tube neural). La culture de cellules ES où le gène HIF-1 $\alpha$  a été inactivé (ES  $-/-$ ) montre un comportement différent de celui des cellules sauvages (ES  $+/+$ ). L'hypoxie et l'hypoglycémie réduisent, en effet, la prolifération cellulaire et augmentent l'apoptose des cellules ES  $+/+$ , alors que les cellules ES  $-/-$  continuent à proliférer. En outre, la croissance de tumeurs développées à partir de cellules souches embryonnaires chez la souris est accélérée lorsque ces cellules sont dépourvues de HIF-1 $\alpha$ . Ceci révèle le rôle important de ce gène dans le contrôle de la croissance et de la mort cellulaire, en condition hypoxique. Il existe d'autres facteurs transcriptionnels inductibles par l'hypoxie, notamment le gène EPAS-1, de structure similaire à celle d'HIF-1 $\alpha$  et d'ARNT. EPAS-1 est régulé par l'hypoxie, augmente la transcription de VEGF et du récepteur endothélial des angiopoïétines, Tie-2. Toutefois, l'inactivation récente d'EPAS-1 chez la souris entraîne une mort embryonnaire à dix jours, sans anomalie vasculaire majeure. La létalité serait liée à une bradycardie due à une diminution de la production de catécholamines par des structures embryonnaires comme l'organe de Zuckerkindl. Les embryons EPAS-1  $-/-$  peuvent survivre lorsque les femelles gestantes reçoivent un précurseur des catécholamines durant leur gestation.

Certains facteurs de la coagulation interviennent aussi dans l'élaboration de la paroi des vaisseaux au cours de la vie embryonnaire. L'inactivation du gène du facteur tissulaire (TF  $-/-$ ), le premier élément de la voie extrinsèque de la coagulation, entraîne une létalité à dix jours de vie embryonnaire, une fragilité

accrue des capillaires du sac vitellin avec formation de micro-anévrismes et de lacs sanguins. On observe une diminution des cellules mésenchymateuses, des cellules musculaires lisses vasculaires et de la matrice extracellulaire. Le facteur tissulaire active le facteur VII mais l'inactivation du gène du facteur VII (souris facteurs VII  $-/-$ ) donne un phénotype différent de celui des souris TF  $-/-$ . Les souris facteur VII  $-/-$  décèdent rapidement d'hémorragie post-natale du fait d'une absence de formation du caillot mais il n'existe pas d'anomalie vasculaire. Ceci montre que le facteur tissulaire exerce un contrôle sur la morphogénèse des vaisseaux mais que cette action est indépendante de l'activation du facteur VII. Le facteur V, dont l'activation permet la génération de thrombine à partir de la prothrombine, est aussi impliqué dans l'angiogénèse. L'inactivation de ce facteur entraîne chez 50 % des animaux une létalité à neuf-dix jours de vie embryonnaire. On observe des plexus vasculaires élargis, une anomalie des parois vasculaires. Enfin, le récepteur de la thrombine pourrait être, lui aussi impliqué dans l'angiogénèse ; son inactivation entraîne un retard de croissance global, sans hémorragie.

Le système de la fibrinolyse (plasminogène/plasmine) n'est pas impliqué dans l'angiogénèse. En revanche, les différents éléments de ce système interviennent à titre divers dans le remodelage de la paroi vasculaire lors de processus pathologiques tels que la formation de la néointima qui suit la dénudation endothéliale, la génération de plaques d'athérome et la formation d'anévrismes. Par une série d'expériences récentes, le groupe de P. Carmeliet et D. Collen (Louvain, Belgique) a montré le rôle de ces gènes en utilisant des souris dont les différents gènes impliqués dans le contrôle de fibrinolyse ont été inactivés. Dans un modèle d'agression vasculaire de la néointima par courant électrique chez la souris, ce groupe a montré que la formation de la néointima était réduite chez les souris déficitaires en activateurs du plasminogène du type urokinase (u-PA) ou déficiente en plasminogène. Les lésions d'athérosclérose provoquées par un régime riche en cholestérol chez les souris déficitaires en apolipoprotéine E (APoE  $-/-$ ) ont été étudiées en croisant ces souris avec des souris déficitaires en activateurs tissulaires du plasminogène (t-PA, u-PA) ou en inhibiteur de l'activateur du plasminogène (PAI-1). Les souris ayant le génotype t-PA  $-/-$  et APoE  $-/-$  (tPA  $-/-$  / ApoE  $-/-$ ) ont le même phénotype que les souris APoE  $-/-$  mais le déficit génétique en u-PA ou en PAI-1 ralentit considérablement la destruction de la média et la fragmentation de l'élastine chez les souris ApoE  $-/-$ . Ceci est vraisemblablement lié à l'activation des protéases matricielles chez la souris APoE  $-/-$  et APoE  $-/-$  / t-PA  $-/-$ . Cette activation est ralentie chez les souris déficitaires en u-PA ou en PAI-1. Le contrôle de l'expression et/ou de l'activité des protéases matricielles par les facteurs de la fibrinolyse a été aussi étudié par E. Allaire et coll. dans un modèle d'anévrisme aortique chez le rat. La mise en place d'une xéno greffe aortique chez le rat entraîne rapidement un anévrisme et sa rupture. La surexpression d'un inhibiteur des métalloprotéases matricielles (TIMP-1) ou de PAI-1 par transfert génique ralentit la progression de l'anévrisme dans ce modèle. Il est donc possible de relier le système de la fibrinolyse et des métalloprotéases

matricielles dans les phénomènes de modelage et remodelage vasculaire au cours des processus dégénératifs vasculaires. Les macrophages sont susceptibles de produire ou d'activer le système de fibrinolyse *via* notamment u-PA qui, à son tour, active les prométalloprotéases matricielles. Celles-ci dégradent l'élastine et favorisent la formation d'anévrismes. La plasmine générée par ce système peut aussi permettre la migration des cellules et la prédigestion des glycoprotéines autour de l'élastine, le tout contribuant à la destruction de la média et à la formation de l'anévrisme.

Un certain nombre de critères caractérisent un facteur angiogénique tel que le VEGF ou le Fibroblast Growth Factor (FGF). *In vivo*, un facteur angiogénique génère de nouveaux vaisseaux dans des modèles établis tels que la cornée avasculaire de lapin. A l'inverse, l'inactivation génique d'un tel facteur ou son inhibition pharmacologique entraîne un défaut d'angiogénèse lors de la vie embryonnaire, des perturbations du modelage ou du remodelage vasculaire. *In vitro*, le phénotype angiogénique se caractérise par plusieurs effets : action mitogénique sur les cellules endothéliales et/ou musculaires lisses vasculaires ; migration des cellules endothéliales ; induction de protéases ; induction de structures capillaires en trois dimensions en culture cellulaire. Enfin, un facteur angiogénique est mis en jeu lors de l'hypoxie systémique et locale et peut être régulé par des cytokines ou des facteurs de croissance. Le rôle de tels facteurs est de contribuer à l'angiogénèse physiologique et également pathologique (croissance tumorale, rétinopathie diabétique).

Les propriétés angiogéniques potentielles de deux systèmes, les systèmes rénine-angiotensine et endothéline, ont été discutées en fonction de ces critères rigoureux. L'angiotensine II présente plusieurs des critères attendus d'un véritable facteur angiogénique. *In vivo*, elle est capable d'entraîner une néovascularisation dans la cornée de lapin, d'induire une angiogénèse dans la membrane chorioallantoïdienne d'embryon de poulet, de provoquer une angiogénèse dans un modèle d'implant (éponge) chez la souris. Toutefois, ces effets sont observés à des concentrations importantes de peptide. La perfusion d'angiotensine II stimule la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires chez le rat mais il est difficile de savoir s'il s'agit d'un effet direct ou indirect médié par l'élévation de la pression artérielle. L'administration locale d'angiotensine II, au niveau de l'adventice de la carotide de rat, ne provoque pas d'hypertension artérielle systémique et induit une néoangiogénèse dans l'adventice. L'effet angiogénique de l'angiotensine II est étayé par les résultats obtenus lors de l'inhibition de la formation (ou de l'action) de l'angiotensine II. L'inhibition pharmacologique de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE) ou le blocage du récepteur de l'angiotensine II (AT<sub>1</sub>) au cours de l'embryogénèse entraîne une raréfaction des artérioles au niveau du rein. De même, l'invalidation du gène de l'ACE entraîne des anomalies des artérioles terminales rénales chez la souris. Ces résultats sont à rapprocher de ceux observés au cours de l'administration d'inhibiteurs d'ACE ou d'antagonistes du récepteur de l'angiotensine II dans le modèle de déendothé-



lisation de la carotide chez le rat. Ces bloqueurs du système rénine-angiotensine entraînent une inhibition de la prolifération néointimale qui suit normalement cette agression vasculaire. Toutefois, les résultats observés dans ce modèle expérimental particulier n'ont pu être reproduits dans d'autres modèles expérimentaux similaires chez des plus gros animaux (lapin, porc). Les résultats chez l'homme ont été aussi décevants : l'administration d'un inhibiteur de l'enzyme de conversion ne prévient pas la resténose des artères coronaires qui suit fréquemment l'angioplastie coronaire.

*In vitro*, l'angiotensine exerce principalement un effet hypertrophique sur les cellules musculaires lisses vasculaires. Un effet hyperplasique sur ces cellules est discret et plus difficile à mettre en évidence. L'action de l'angiotensine II sur la croissance des cellules musculaires lisses vasculaires met en jeu plusieurs facteurs de croissance autocrines ou paracrines : PDGF, FGF, ... L'angiotensine exerce aussi un effet mitogénique sur les cellules endothéliales de certains capillaires, comme les capillaires rétiniens. Elle est enfin capable d'augmenter les composants de la matrice extracellulaire synthétisés et sécrétés par les cellules musculaires lisses vasculaires, tels que la fibronectine. D'autres critères remplis par les facteurs de croissance vasculaire « classiques » comme le VEGF et le FGF n'ont pas été ou incomplètement étudiés dans le cas de l'angiotensine : rôle de l'angiotensine dans la migration des cellules endothéliales, possibilité d'induction de protéases, induction de structure capillaire en trois dimensions, effet sur la perméabilité capillaire ?

Les effets angiogéniques de l'angiotensine pourraient avoir des applications cliniques. Il a été montré que le captopril, à concentration micromolaire (à vrai dire, bien supérieure à celle requise pour inhiber l'ACE), est capable d'inhiber l'angiogénèse et de ralentir la croissance de tumeurs expérimentales chez la souris. Les inhibiteurs d'ACE, et non les autres antihypertenseurs, diminueraient le risque relatif de cancer chez l'homme, d'après une récente étude rétrospective sur une population d'hypertendus en Ecosse. Enfin, le débat est ouvert sur un effet bénéfique des inhibiteurs d'ACE dans la rétinopathie proliférative diabétique. Il s'agit donc là d'une ligne de recherche intéressante dont les applications thérapeutiques chez l'homme peuvent être prometteuses.

Peu de travaux concernent un effet potentiellement angiogénique des endothélines. *In vivo*, il n'existe pas d'effet angiogénique démontré des endothélines dans un modèle établi d'angiogénèse tel que l'implant d'éponge chez le rongeur. En revanche, on observe une augmentation de l'épaisseur de la néointima lors de l'administration intra-artérielle d'endothéline 1 et une régression de cette épaisseur néointimale lors d'un traitement par un antagoniste du récepteur  $ET_A$  de l'endothéline. L'inactivation génique de l'endothéline 1 et du récepteur  $ET_A$  entraîne des anomalies du développement de la crosse aortique et des gros vaisseaux de la base, impliquant ce système dans la morphogénèse des tissus dérivés des cellules de la crête neurale. Il n'a pas été rapporté d'anomalies des plus petits vaisseaux ou des capillaires. *In vitro*, l'endothéline possède quelques uns des

critères d'un facteur angiogénique car elle exerce un effet mitogénique sur les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses vasculaires et les cellules mésangiales glomérulaires. Il existe vraisemblablement une interaction entre l'endothéline et les facteurs de croissance vasculaire comme le montre la stimulation de la sécrétion de VEGF par  $ET_1$ . Le développement rapide en expérimentation et en clinique humaine des antagonistes des deux récepteurs de l'endothéline,  $ET_A$  et  $ET_B$ , permettra de savoir si l'endothéline participe à l'angiogénèse physiologique ou pathologique dans la progression tumorale, dans la rétinopathie diabétique ou dans d'autres pathologies.

P. C.

#### RAPPORT D'ACTIVITÉ DU LABORATOIRE

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

Équipe : F. PINET, S. GERMAIN (départ octobre 98), S. FUCHS, J. PHILIPPE, G. EGIGY

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.

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

Trois modèles de cellules productrices de rénine ont été utilisés pour étudier la régulation de la transcription du gène de la rénine : les cellules chorioniques et les cellules Calu-6 dérivées d'un carcinome pulmonaire (d'origine humaine et extra-rénale) ainsi que les cellules As4.1 (d'origine murine et rénale). Ce travail a permis d'aborder deux questions importantes : 1/ Quels sont les facteurs nucléaires permettant une expression du gène de la rénine dans les cellules juxta-glomérulaires du rein et les cellules chorioniques ? 2/ Quels sont les mécanismes responsables au niveau transcriptionnel d'une inhibition de la sécrétion de rénine en réponse à une augmentation du calcium intracellulaire ?

#### ***Cartographie du promoteur distal et du premier intron du gène de la rénine humaine***

Le criblage d'une banque de cosmides en 1996 ayant permis de cloner 19 Kb de la région 5', le premier intron dans sa totalité (3.9 Kb) ainsi que 5 Kb de la

région 3' ouvrait de nouvelles perspectives pour identifier d'importantes régions régulatrices du gène de la rénine. Nous avons 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.*, 1997). Cette activité de répression est spécifique des cellules productrices de rénine et l'intégrité du premier intron est nécessaire pour cette activité (Germain *et al.*, 1999).

Nous avons effectué une analyse fonctionnelle sur les 9000 bp en amont du site d'initiation de la transcription. Un « enhancer » a été localisé entre -5777 bp et -5552 bp. Cette région de 225 bp augmente l'activité basale des 892 bp du promoteur proximal dans les différents types de cellules productrices de rénine, avec une efficacité beaucoup plus élevée dans les cellules chorioniques (60 fois) que dans les cellules Calu-6 (13 fois) et les cellules As4.1 (5 fois). Par les techniques d'empreinte à la DNase I et de gel retard, trois régions dans les 225 bp interagissant avec des protéines nucléaires chorioniques ont été identifiées. Aucune de ces régions, à elle seule, ne reproduit cette activité transcriptionnelle. Ces résultats suggèrent que cette région joue un rôle dans l'expression du gène de la rénine au niveau du chorion (Germain *et al.*, 1998).

### **Caractérisation du promoteur de la rénine humaine par transgénèse**

La stratégie utilisée repose sur les résultats obtenus au laboratoire à partir des modèles *ex vivo* qui ont permis d'identifier le promoteur basal de la rénine humaine et des régions importantes interagissant avec plusieurs facteurs transcriptionnels d'origine chorionique et rénale. Plusieurs constructions de la région 5' du gène de la rénine, notamment celles contenant l'enhancer situé entre -5777 bp et -5552 bp, associées au gène LacZ ont été injectées. La stratégie employée consiste à regarder l'expression du transgène au stade embryonnaire E15 (la rénine étant exprimée chez l'embryon à ce stade) avant d'établir des lignées. Nous avons établis différentes lignées contenant 12000 bp du promoteur de la rénine qui exprimait le transgène au niveau du rein au stade E16 de l'embryon. La corrélation de la localisation nucléaire du transgène par coloration de la  $\beta$ -galactosidase avec le marquage immunohistochimique de la rénine est en cours.

Projets en cours :

a) *Détermination des mécanismes transcriptionnels impliqués dans la régulation par le calcium intracellulaire.* *In vivo*, une inhibition de la sécrétion de rénine a été observée en réponse à une augmentation du calcium intracellulaire. Un élément nCaRE a été identifié à -1780 bp dans le promoteur de la rénine, ainsi que plusieurs autres dans des régions 5' plus distales. La fonctionnalité de l'élément nCaRE à -1,7 Kb en faisant varier les différentes conditions de calcium intracellulaire a été montrée dans le modèle des cellules chorioniques. Les interactions moléculaires ADN-protéines sont en cours d'analyse par les techniques de gel retard et de footprint.

b) *Clonage des facteurs de transcription spécifiques des tissus exprimant la rénine.* Ceci sera effectué par plusieurs approches dont la technique de simple hybride en préparant une banque d'ADNc de cellules juxtaglomérulaires et/ou de cellules chorioniques.

c) *Facteurs moléculaires impliqués dans le recrutement des cellules juxtaglomérulaires lors d'une hypertension rénovasculaire.* Pour répondre à cette question, un modèle expérimental d'hypertension artérielle rénovasculaire sera utilisé : sténose sur une artère rénale, l'autre rein étant présent (1 clip - 2 reins) chez le rat Lewis. Nous étudierons les différences d'expression des gènes (apparition, disparition) entre les deux reins (rein clippé, rein normal) par la technique de « Differential Display » en suivant un protocole modifié de Liang et Pardee (1992).

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

Les questions posées sont : 1/ spécificité de l'ECE vis-à-vis des substrats et des inhibiteurs ? ; 2/ rôle de l'ECE dans un contexte physiopathologique ?

### ***Développement d'outils et de modèles***

Nous avons exprimé les trois isoformes de l'ECE-1 en cellules eucaryotes en collaboration avec C. Tougard. 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. 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 ont été caractérisées.

### ***Distribution et caractérisation de l'ECE-1 humaine***

Un profil similaire d'expression du mRNA de l'ECE-1 et de la protéine a été observé dans la plupart des tissus humains non pathologiques. Son expression est particulièrement élevée dans les systèmes cardiovasculaire, reproducteur et endocrine. De plus une très forte expression a été trouvée au niveau de la surrénale avec une expression majeure au niveau de la zone glomérulée. Ceci suggère que l'ECE peut être impliquée dans d'autres systèmes paracrines que seulement la maturation de la bigET-1 (Korth *et al.*, 1999).

L'expression (hybridation *in situ*, immunocytochimie) et la régulation différentielle (RT/PCR) du système endothéline a été étudiée dans les adénocarcinomes de colon, par comparaison à du tissu sain et du tissu tumoral en collaboration

avec L. Juillerat-Jeanneret (Lausanne, Suisse). Il apparaît que le système endothéline est hyperactivé dans les tumeurs et fonctionne de façon paracrine vis-à-vis des vaisseaux et myofibroblastes du stroma. L'apparition d'ET-B, par son effet vasodilatateur pourrait alimenter la croissance tumorale. Il semble donc y avoir une corrélation de l'expression spatiale du système endothéline avec l'angiogénèse dans certains cancers (Egidy *et al.*, soumis).

Projets en cours :

a) *Recherche d'inhibiteurs.* En utilisant les banques de peptides phosphiniques développés par chimie combinatoire, nous essayons de développer des inhibiteurs spécifiques de l'ECE, en collaboration avec V. Dive (CEA, Saclay).

b) *Rôle de l'ECE dans la surrenale.* L'expression des trois gènes de l'ECE sera étudiée dans les hyperaldostéronismes primaires tumoraux (adénome de Conn) par les techniques de Northern Blot, d'hybridation in situ et d'immunohistochimie.

c) *Rôle du système endothéline dans la maladie de Hirschsprung.* Le groupe de S. Lyonnet et A. Munnich (U393) a découvert des mutations du récepteur ET-B (Amiel *et al.*, 1996) chez des patients atteints de la maladie de Hirschsprung. Nous nous proposons d'étudier le rôle fonctionnel de ces mutations (G57S, R319W et P383L) dans des lignées de cellules recombinantes.

d) *Rôle du système endothéline dans l'angiogénèse.* En utilisant différents modèles d'angiogénèse *ex vivo*, l'expression des différents composés du système endothéline sera testé ainsi que les différents bloqueurs du système.

## II — PEPTIDES-HORMONES ET DÉVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE

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

Le rôle au cours du développement embryonnaire et fœtal de certains peptides connus pour leurs fonctions hormonales sur le système cardiovasculaire a été mis en évidence récemment à la suite des inactivations de gènes chez la souris. Nous avons entrepris d'établir un modèle expérimental plus simple et ne nécessitant pas d'installation particulière pour réaliser une inactivation non pas du gène lui-même mais du produit d'un gène. Cette inactivation pharmacologique a l'avantage de pouvoir être effectuée au moment approprié au cours du développement, et pas seulement sur les cellules embryonnaires souches au tout début du développement. L'embryon de poulet, que nous utilisons comme matériel expérimental pour ce type d'inactivation pharmacologique, présente des caractéristiques intéressantes : simplicité, rapidité, investissements et coûts réduits. Deux autres avantages majeurs soulignent encore l'intérêt de cette approche technologique : d'une part, il est possible d'obtenir un très grand nombre d'embryons en quelques

semaines, et d'autre part, l'inactivation peut être réalisée à tout moment depuis le début du développement embryonnaire et être arrêtée à volonté. Ce modèle expérimental a été utilisé avec succès sur le système des endothélines pour inactiver le récepteur de type A ( $ET_A$ ). Il a été montré (H. KEMPF, *Development*, 1998, 125, pp. 4931-4941) que cette inactivation de l'un des deux récepteurs des endothélines produit un phénotype identique à celui des souris dont le gène homologue a été inactivé.

Cette approche méthodologique d'inactivation du produit d'un gène au cours du développement est actuellement utilisée pour définir et caractériser le rôle éventuel d'autres peptides, enzymes ou récepteurs, particulièrement ceux impliqués chez l'adulte dans la fonction cardiovasculaire.

## 1. Endothélines et Cardiogénèse

Grâce à l'inactivation pharmacologique du récepteur  $ET_A$  des endothélines, il a été montré que la fenêtre de sensibilité à l'endothéline 1, via ce récepteur, du composant ecto-mésenchymateux des arcs branchiaux durait environ 24-36 heures dans l'embryon de poulet de 3 à 4 jours d'incubation. Cette période correspond à l'installation, à la prolifération et à la différenciation des cellules de crêtes neurales qui ont colonisé cette région aux stades antérieurs. Le traitement avec un antagoniste du récepteur  $ET_A$  n'empêche ni le cœur, ni les gros troncs artériels de se former, mais produit des malformations (absence de septation ventriculaire, plan anormal d'organisation des vaisseaux) caractéristiques des déficiences en cellules de crêtes neurales (neurocristopathies). Nous savons déjà que la colonisation des arcs branchiaux n'est pas en cause puisque, d'une part les cellules de crêtes neurales qui colonisent les arcs branchiaux n'expriment pas le récepteur  $ET_A$  qui est responsable de ces anomalies, d'autre part il ne semble pas y avoir de déficit quantitatif de cellules qui arrivent dans ces arcs branchiaux. Le travail en cours vise à établir si la prolifération (et/ou l'apoptose) ou la différenciation des cellules de crêtes neurales est la cause de ces malformations. Nous étudions particulièrement la cascade des étapes qui sont en aval du récepteur des endothélines (dHand, eHand, Msx1 ...) et qui pourraient être à l'origine des malformations observées.

## 2. Angiogenèse Normale et Pathologique

### *Rôle du facteur de transcription EPAS1*

EPAS1 (aussi appelé HIF2a) est un facteur de transcription de type bHLH-PAS qui est abondamment exprimé dans la paroi vasculaire et est capable d'activer *in vitro* l'expression du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) et du récepteur des angiopoïétines Tie-2. Afin de comprendre son rôle dans l'angiogénèse, et plus particulièrement pendant le développement embryo-

foetal, nous étudions ce nouveau facteur dans un modèle animal simple, l'embryon de poulet. Nous avons cloné l'homologue aviaire d'EPAS1 qui présente une identité protéique de 79 % avec l'ensemble de la séquence humaine, et de 95 % dans les motifs conservés bHLH et PAS. Une étude comparative détaillée de l'expression d'EPAS1 lors du développement embryonnaire humain et aviaire par hybridation *in situ* a révélé une expression très précoce d'EPAS1 dans la paroi des vaisseaux sanguins, dans les cellules endothéliales, mais aussi dans les péricytes ou les premières couches de cellules musculaires lisses de certains vaisseaux. En dehors du système vasculaire, EPAS1 est de plus fortement exprimé dans le foie, les glomérules du mésonéphros et les neurones du système sympathique. Cette dernière observation s'accorde avec les récents résultats d'inactivation génique chez la souris qui montrent un rôle majeur d'EPAS1 dans la régulation de la sécrétion des catécholamines dans le fœtus de souris. Nous avons étudié, en hybridation *in situ* et par dot blot, la régulation *in ovo* du messager d'EPAS1 en conditions hypoxiques (15 % d'O<sub>2</sub>) qui induisent une angiogenèse embryonnaire accrue. Nos résultats suggèrent fortement qu'EPAS1 participe à la mise en place du réseau vasculaire de l'embryon. Des observations préliminaires indiquent un rôle comparable dans l'angiogenèse physiopathologique et pathologique (divers types de tumeurs) chez l'homme adulte.

### ***Le modèle expérimental de la membrane chorio-allantoïdienne (CAM)***

La formation de nouveaux vaisseaux sanguins, que ce soit dans le développement normal ou dans des conditions pathologiques, suscite un grand intérêt tant du point de vue de la connaissance fondamentale que des possibles avancées cliniques. Ce domaine de recherche très actif a largement bénéficié des apports récents de la biologie moléculaire, particulièrement de l'inactivation des gènes et de l'hybridation *in situ*, pour caractériser le rôle et les interactions des facteurs de croissance et de transcription impliqués dans les différentes étapes de l'angiogenèse.

Nous avons choisi la membrane chorio-allantoïdienne de l'embryon de poulet comme modèle expérimental de l'angiogenèse. Cette membrane, qui est une des annexes de l'embryon, est pendant environ une semaine le siège d'une angiogenèse très active. Nous utilisons cette membrane de deux façons différentes. D'une part, la vascularisation de la CAM sert de cible pour tester les effets (anti)angiogéniques de différents facteurs ou combinaisons de facteurs, et de conditions physiques (hypoxie). D'autre part, la capacité des vaisseaux de la CAM à envahir et à vasculariser une cible, constituée par tout tissu mis à son contact, sert pour établir les conditions optimales de colonisation d'un nodule de tissu normal ou tumoral greffé sur la CAM. L'invasion d'une tumeur par des vaisseaux qui assurent l'oxygénation et les apports nutritifs étant la condition limitante de sa croissance, ce système peut être utilisé pour interférer (stimuler ou inhiber) la croissance du tissu pris pour cible.

Afin d'établir la validité et les limites de la CAM comme modèle expérimental nous l'avons utilisée pour montrer les effets de certains peptides vasoactifs (angiotensine, endothélines), qui peuvent induire directement l'angiogénèse, ou d'autres substances connues pour agir indirectement sur l'angiogénèse telles que l'héparine, l'histamine. Avec ce modèle expérimental nous commençons aussi à aborder l'étude des situations patho-physiologiques telles que l'hypoxie, l'ischémie locale et la cicatrisation.

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

Équipe : P. CORVOL, M. PAGANO, A. MICHAUD, X. HOUARD, L. BOUJENNAH  
(départ décembre 1998)

#### **1. Enzyme de conversion de l'angiotensine**

L'enzyme de conversion de l'angiotensine de mammifère comporte deux sites actifs, les domaines catalytiques N- et C-terminaux. En collaboration avec l'équipe du Pr. Elwyn Isaac (Department of Biology, University of Leeds, UK), nous avons identifié, cloné et séquencé un équivalent de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE) chez la drosophile. Cette enzyme, appelée AnCE, ne possède qu'un des deux sites actifs de l'ACE de mammifère et est dénuée d'une pièce d'ancrage hydrophobe qui insère la protéine dans la membrane plasmique chez les mammifères.

Nous avons découvert l'existence d'une autre enzyme proche de AnCE, appelée ACER (enzyme reliée à l'ACE) qui possède 65 % de similarité au niveau des acides aminés avec AnCE. AnCE et ACER sont exprimées au cours de l'embryogénèse et tout au long des stades post-embryonnaires chez la drosophile. AnCE et ACER sont détectées dans les cellules cardiaques embryonnaires. AnCE est en outre présente dans l'amniosérosa et l'intestin. Nous avons exprimé ACER à large échelle dans *Pichia Pastoris* et étudié ses principales propriétés enzymatiques. A l'inverse de AnCE, ACER n'est pas capable d'hydrolyser un substrat octapeptidique comme l'angiotensine I. Ceci permet de distinguer l'activité d'ACER de celle d'AnCE puisque les deux enzymes hydrolysent par ailleurs de façon similaire des substrats tripeptidiques comme Hip-His-Leu. AnCE et ACER ont aussi une activité endopeptidasique sur des substrats courts amidés telles que les enképhalinamides. Ces deux enzymes sont exprimées alternativement au cours du développement de la nymphe de drosophile (stade P1 à P15).

Un nouveau rôle a été sans doute découvert pour l'ACE grâce à l'étude des ACES d'insectes. Un certain nombre d'arguments suggèrerait que les ACES de mammifère et d'insecte puissent être impliquées dans le métabolisme des hormones peptidiques. Une étude récente, effectuée en collaboration avec l'équipe de biochimie de Leeds, a montré une colocalisation de l'ACE dans des tissus



neuroendocriniens et des cellules neurosécrétoires du système nerveux central chez les insectes, notamment le criquet. En particulier, une colocalisation a été découverte entre l'ACE et la locustamyotropine. Le précurseur de ce peptide comporte une séquence Lysine-Arginine ou Arginine-Arginine en C-terminal. La carboxypeptidase E/H peut effectuer la libération séquentielle de ces deux acides aminés basiques pour libérer le peptide actif. Nous avons montré, *in vitro*, que l'ACE clivait très efficacement le dipeptide basique pour générer le peptide actif. Cette nouvelle activité de l'ACE d'insecte est 50 fois plus efficace que celle de l'ACE sur l'angiotensine I. En outre, comme dans le cas de la maturation de l'angiotensine I en angiotensine II, l'ACE est très peu efficace sur toute hydrolyse ultérieure du peptide. Le rôle ancestral de l'ACE pourrait être donc celui d'une « prohormone convertase », permettant la maturation terminale du peptide actif. Cette hypothèse de travail sera évaluée chez le mammifère où le rôle de l'ACE testiculaire reste encore inconnu. Cette ACE, qui ne comporte qu'un domaine catalytique, est impliquée dans la fécondité masculine. Il est possible que l'ACE participe à la maturation d'un peptide intervenant dans la fécondité.

## 2. Fibronectine et Protéase

Maurice Pagano, maître de conférences en biochimie à l'université Paris VI, à rejoint le laboratoire en septembre 1998 ainsi que Laziz Boudjennah, étudiant en fin de thèse de sciences. Le thème de recherche de cette équipe était la dégradation des lames basales par les cystéine-protéases.

La lame basale est une structure très résistante constituée principalement d'un réseau de collagène IV et d'un réseau de laminine associés à la fibronectine cellulaire et à d'autres constituants, tels que les protéoglycanes. Ce phénomène de protéolyse pathologique participe à l'invasion tumorale, en favorisant la migration cellulaire. Ce travail a été réalisé au moyen d'une membrane basale modèle, la capsule de cristallin de bœuf. Pendant la digestion de cette lame basale modèle, une activité gélatinase est apparue, et nous avons montré qu'il s'agissait d'une enzyme présente dans la fibronectine cellulaire. La collagénase cryptique de la fibronectine a été purifiée et caractérisée : c'est une metalloprotéase à zinc localisée dans le domaine liant la gélatine de la fibronectine. Elle possède les séquences consensus de la famille des thiol-métalloprotéases au site catalytique, et elle aussi apparentée aux protéases matricielles 2 et 9, car elle contient deux domaines liant la gélatine et le collagène comme ces deux protéases matricielles (Boudjennah *et al.*, 1998).

Depuis Septembre 1998, nous travaillons sur le rôle possible cette protéase dans le modelage vasculaire et l'angiogénèse. Ce projet représente le sujet de thèse de sciences de Xavier Houard. En effet, la formation des néo-vaisseaux est observée avec des cellules endothéliales cultivées sur une matrice extra-cellulaire (type matrigel), ce phénomène dépend des metalloproteases matricielles MMPs 2 et 9 et il est bloqué par les inhibiteurs peptidiques de ces protéases, les TIMPs 1

et 2. Dans d'autres modèles expérimentaux, l'élongation des néo-vaisseaux est dépendante de la fibronectine ajoutée au milieu de culture. Dans le vaisseau, les protéines de la matrice extra-cellulaire sont surtout biosynthétisées par les cellules musculaires lisses vasculaires, et sous l'effet de l'angiotensine II, la biosynthèse de la fibronectine et du collagène de type I est augmentée. Des cultures primaires de ce type cellulaire chez le rat sont réalisées au laboratoire pour étudier le rôle de la fibronectine et de sa protéase cryptique dans l'angiogenèse et les processus de modelage vasculaire. Ces cellules sécrètent également des protéases matricielles comme MMP2 et aussi leurs inhibiteurs TIMPS 1 et 2. De plus, l'expression de MMP2 semble augmentée par l'angiotensine II.

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

Équipe : C. TOUGARD, E. VILA-PORCILE, S. HAMMAMI (départ septembre 1998), A. BARRET, F. MONGIAT (à temps partiel), P. LARDEMER, E. ETIENNE

Au cours de l'année écoulée, le groupe a poursuivi ses recherches d'une part sur le trafic et l'adressage des isoformes de l'enzyme de conversion de l'endothéline et d'autre part sur l'étude du système rénine-angiotensine dans l'antéhypophyse du rat.

##### **1. Étude du trafic et de l'adressage des isoformes de l'enzyme de conversion de l'endothéline**

L'enzyme de conversion de l'endothéline (ECE) est l'enzyme-clé responsable de la dernière étape de maturation protéolytique du précurseur de l'endothéline qui donne naissance au peptide actif. Plusieurs isoformes de l'ECE-1, qui est la forme majoritaire de l'ECE, ont été identifiées chez l'homme et résultent de l'épissage alternatif d'un seul gène (Schweizer *et al.*, 1997). Ces isoformes (ECE-1a, ECE-1b et ECE-1c), qui ne diffèrent que par la partie N-terminale de leur court domaine cytoplasmique, clivent la big-endothéline avec la même efficacité mais semblent présenter une localisation distincte à l'intérieur et/ou à la surface des cellules. Pour tenter de mieux comprendre le rôle physiologique joué par chacune de ces isoformes dans la formation locale d'endothéline nous avons dans un premier temps étudié, par immunofluorescence et par immunocytochimie ultrastructurale, la distribution subcellulaire de ces isoformes dans des lignées de cellules endothéliales. Pendant la réalisation de cette étude, une 4<sup>e</sup> isoforme, produite par le même gène grâce à l'utilisation d'un 4<sup>e</sup> promoteur, a été clonée (Valdenaire *et al.*, sous presse). Les outils immunologiques dont nous disposions permettaient de localiser spécifiquement l'ECE-1a à la surface des cellules endothéliales mais ne permettaient pas de différencier la localisation des autres

isoformes. Nous avons alors, en collaboration avec Olivier Valdenaire (INSERM U460-Paris), utilisé des modèles de lignées stables de cellules CHO transfectées respectivement avec le cDNA codant pour chaque isoforme.

### *1. Localisation subcellulaire des 4 isoformes de l'ECE-1 humaine*

Nous avons pu montrer que, dans les cellules CHO transfectées, l'ECE-1a est principalement détectée à la surface des cellules alors que l'ECE-1b est détectée au niveau de l'appareil de Golgi et de structures endosomales et est donc exclusivement intracellulaire. L'ECE-1c et l'ECE-1d présentent une distribution intermédiaire et sont localisées à la fois à la surface des cellules, mais à un moindre degré que l'ECE-1a, et dans certains compartiments intracellulaires correspondant à des compartiments d'endocytose.

### *2. Identification de 2 signaux d'adressage responsables de la localisation intracellulaire de l'ECE-1b*

Pour caractériser les mécanismes moléculaires mis en jeu dans l'adressage différentiel des isoformes de l'ECE-1, nous avons mis en œuvre, en collaboration avec O. Valdenaire, une approche de mutagenèse dirigée dans les domaines cytoplasmiques spécifiques de chacune des isoformes. Nous avons ainsi pu mettre en évidence la présence de deux motifs di-leucine dans l'extrémité N-terminale de l'ECE-1b responsables de la localisation exclusivement intracellulaire de cette isoforme alors que la présence de l'un de ces motifs dans l'extrémité N-terminale des isoformes ECE-1c et ECE-1d pourrait être responsable de leur expression modérée, par rapport à l'isoforme ECE-1a, à la surface de la cellule. Nous envisageons de poursuivre ces recherches en étudiant le tri et l'adressage respectif de ces isoformes, qui seront « étiquetées » par des marqueurs qui permettront de les distinguer les unes des autres, dans des cellules endothéliales cultivées dans des conditions qui préservent leur polarité. Nous espérons recueillir ainsi des informations supplémentaires sur la signification fonctionnelle de la diversité moléculaire des isoformes de l'ECE-1.

## **2. Le système rénine-angiotensine dans l'adénohypophyse du rat**

Des résultats antérieurs avaient montré par immunocytochimie ultrastructurale que des composants du système rénine-angiotensine étaient synthétisés et maturés dans les compartiments subcellulaires des différents types de cellules adénohypophysaires. De plus, l'application du « Reverse Hemolytic Plaque Assay » (RHPA), une technique qui permet d'évaluer individuellement la sécrétion cellulaire, avait indiqué que ces composants pouvaient être sécrétés, mais à des taux très variables selon les types cellulaires.

Ce travail a été poursuivi, en étudiant plus spécifiquement la distribution et la sécrétion des composants dans le cas des cellules lactotropes normales et tumo-

rales (cellules de la lignée GH3B6) à l'aide de nouveaux anticorps dirigés contre la rénine, l'angiotensine I (A I) et l'angiotensine II (AII), aimablement fournis par J. Sealey (New York). L'immunocytochimie ultrastructurale a révélé la présence de ces trois composants dans les saccules et les vésicules de l'appareil de Golgi des cellules normales, en association avec de forts marquages pour la prorénine et pour l'enzyme de conversion de l'A I (ACE). Dans les cellules GH3, le marquage concerne essentiellement les vésicules de la zone golgienne. Ces trois composants sont détectables à un niveau inférieur dans le réticulum endoplasmique des deux catégories cellulaires.

Ces résultats suggèrent que, si l'essentiel des phénomènes de maturation se produit dans l'appareil de Golgi, des maturations précoces peuvent intervenir au niveau du réticulum endoplasmique.

En ce qui concerne la sécrétion des composants, un niveau basal relativement faible, traduit par la formation de petites plaques d'hémolyse, avait pu être noté précédemment pour tous les composants étudiés, aussi bien pour les cellules lactotropes normales que pour les cellules GH3. L'application de ces nouveaux anticorps a montré qu'en fait, la rénine était sécrétée par 30 % des cellules GH3, et que la sécrétion de l'angiotensine I (AI), qui n'avait pas encore été explorée jusqu'à présent, concernait de 20 à 40 % d'entre elles, et celle de l'angiotensinogène et de l'angiotensine II (AII) de 30 à 45 % de ces cellules. Les cellules lactotropes normales avaient montré précédemment une activité sécrétoire majoritaire pour la prorénine et plus réduite pour l'angiotensinogène, mais les tests effectués grâce à ces nouveaux anticorps indiquent qu'elles sécrètent également les trois autres composants : rénine, AI et AII.

Ces résultats semblent montrer que les cellules lactotropes hypophysaires participent activement à l'élaboration et à la sécrétion des composants d'un système rénine-angiotensine local, dont on peut actuellement penser qu'il est complet et fonctionnel dans l'adénohypophyse du rat. Par ailleurs, ces données indiquent que les cellules de la lignée tumorale GH3B6 conservent les potentialités d'élaboration et de sécrétion des composants du système rénine-angiotensine existant dans les cellules lactotropes normales.

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

Équipe : C. LLORENS-CORTÉS, A. HUS-CITHAREL, N. DE MOTA, Z. LENKEI,  
A. RÉAUX, X. ITURRIOZ, R. ROZENFELD

### **OBJECTIF GÉNÉRAL**

Le principal thème de recherche de ce groupe de travail est l'étude de l'organisation et du rôle fonctionnel du système rénine angiotensine (SRA) cérébral

dans le contrôle central de la pression artérielle et la sécrétion des hormones hypophysaires. L'accent sera mis 1) sur l'identification des enzymes impliquées dans le métabolisme de l'angiotensine II (AngII) et de l'angiotensine III (AngIII), 2) sur la détermination des rôles physiologiques respectifs de l'AngII et de l'AngIII dans le contrôle central des fonctions cardio-vasculaires, 3) sur la distribution, la localisation cellulaire et la caractérisation pharmacologique des récepteurs de l'AngII et de l'AngIII dans le SNC et l'hypophyse. L'aminopeptidase A (APA) qui convertit l'AngII en AngIII sera étudiée en détail.

Parallèlement, un nouveau thème de recherche est mis en place actuellement et concerne l'identification de ligands endogènes de récepteurs orphelins à 7 domaines transmembranaires (GPCRs) présents dans le SNC.

## **1. Ectoenzymes et métabolisme de l'AngII et de l'AngIII cérébrales**

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

#### *1. Objectif*

Une définition approfondie du rôle physiologique de l'APA nécessite l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques et sélectifs. La structure de ces molécules peut-être définie à partir de la modélisation de son site actif. En l'absence de données cristallographiques sur l'APA et sur les aminopeptidases monozincs, nous avons tenté de caractériser certains acides aminés de l'APA impliqués dans l'activité catalytique, la liaison du zinc, du calcium ou du substrat par mutagenèse dirigée et expression des protéines recombinantes dans des cellules eucaryotes.

#### *2. Travaux réalisés*

L'exploration du site actif de l'APA a été poursuivie en caractérisant le résidu impliqué dans la liaison de la partie N-terminale du substrat. Par analogie avec la carboxypeptidase A nous pensons que le caractère amino-exopeptidase pouvait être assuré par la présence dans le sous-site S1, d'un site anionique interagissant avec la fonction amino-terminale libre des substrats. Des travaux de modification chimique sur l'APN ont mis en évidence la présence dans le sous-site S1 d'un glutamate intervenant dans la liaison du substrat. Un tel résidu s'il existe, doit certainement être conservé dans toutes les aminopeptidases monozincs. L'alignement de séquence des aminopeptidases monozincs montre la présence d'un motif très conservé GAME dans lequel le glutamate pourrait être le résidu qui nous intéresse. Nous avons donc remplacé ce résidu (Glu 352 dans l'APA) par une glycine, un aspartate ou une arginine. L'analyse des paramètres cinétiques montre que l'affinité pour le substrat n'est pas modifiée alors que l'efficacité d'hydrolyse est abaissée de 10 à 250 fois selon la substitution. Afin de préciser le rôle exact de ce résidu dans la catalyse enzymatique nous avons déterminé le pouvoir inhibiteur de différents composés reconnaissant l'APA. Tous montrent une chute de leur pouvoir inhibiteur vis-à-vis des mutants de l'APA. Seule la N-acétyl-

angiotensine I dont la partie N-terminale est bloquée ne présente pas de variation dans son pouvoir inhibiteur. Ces résultats montrent que le Glu 352 est impliqué dans la catalyse enzymatique et qu'il contribue à l'activité exopeptidasique de cette enzyme en interagissant avec la partie N-terminale libre des substrats ou des inhibiteurs (**Vazeux et al., 1998, Biochem. J., 334, 407-413**).

### 3. Travaux en projet

- Nous voulons mettre au point une technique de purification rapide des APAs recombinantes en introduisant une séquence de polyhistidines dans la partie N-terminale de ces enzymes qui permettra leur purification par chromatographie d'affinité sur colonne de métaux (cobalt).
- Nous allons continuer la caractérisation du site actif de l'APA en recherchant les acides aminés impliqués dans la liaison du substrat ainsi que ceux impliqués dans la liaison du calcium.

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

### 1. Objectif

La synthèse d'inhibiteurs spécifiques de l'APA est déterminante pour estimer son rôle fonctionnel. La conception et la synthèse de ces produits sont effectuées dans l'U266 de l'INSERM dirigée par B. Roques (Equipe de M.-C. Fournié-Zaluski). Le test d'activité de ces produits sur l'APA recombinante purifiée, sur le métabolisme de l'AngII *in vitro* et *in vivo*, ainsi que leurs effets sur différentes réponses physiologiques seront réalisés à l'Unité 36 de l'INSERM.

### 2. Travaux en cours et projets

Bien que l'EC33 ((S) 3-amino-4-thio-butyl sulfonate) représente le meilleur inhibiteur actuel et qu'il ait été utile pour les premières caractérisations de l'APA, il doit être amélioré au niveau de l'efficacité et de la spécificité afin de permettre des études biochimiques, pharmacologiques et physiologiques de l'APA. Celles-ci nécessitent en effet des affinités nanomolaires ou subnanomolaires pour l'enzyme *in vitro*, une solubilité et une biodisponibilité satisfaisante pour les études *in vivo*. Dans ce but, il est important d'explorer en détail le site actif de l'APA. Pour cela l'équipe de M.-C. Fournié-Zaluski a prévu de synthétiser des inhibiteurs capables de reconnaître les trois principaux sous-sites de liaison S1, S1' et S2' de l'enzyme.

La synthèse des tripeptides suivie de l'utilisation de banques d'inhibiteurs réalisées par chimie combinatoire, a permis de constater que le meilleur résidu accepté en S1 est un glutamate alors qu'il s'agit d'une isoleucine ou d'une tyrosine en S'1, et d'un acide aspartique en S'2. (DEA Christelle DAVID, équipe de MC. Fournié-Zaluski, Lab. B. Roques, travaux réalisés en collaboration avec notre équipe). Le programme a été poursuivi en synthétisant un pseudotripeptide  $\beta$ -aminothiols comportant un glutamate sulfonate en R1, une isoleucine ou une

tyrosine en R1' et un acide aspartique en R2', dont le pouvoir inhibiteur est de l'ordre du nanomolaire. ( $K_i=0,7nM$ )

A partir de ces données, il est possible de prévoir :

- i) la synthèse d'une molécule radiomarquée qui permettra l'étude de la localisation de l'enzyme dans le cerveau et à la périphérie, la disponibilité et le métabolisme *in vivo* de tels inhibiteurs.
- ii) la synthèse de prodrogues permettant l'administration *in vivo* par voie parentérale chez le rat ou la souris, de façon à étudier la pharmacologie de ces inhibiteurs dans le contrôle central ou périphérique de la pression artérielle.

### ***C - Rôles physiologiques de l'aminopeptidase A et de l'aminopeptidase N dans le système renine-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 l'AngIII était le peptide effecteur du SRA cérébral dans le contrôle de la sécrétion de vasopressine (AVP). Afin de compléter ces données, nous avons étudié :

1) *L'effet d'un nouvel inhibiteur d'APN, le PC18, sur le métabolisme des angiotensines cérébrales et sur la sécrétion d'AVP*

L'injection centrale de PC18 (30  $\mu g$ ) chez la souris vigile, induit une augmentation des taux d'AngIII comparés aux taux des témoins, cet effet étant maximal (220 %) entre 7-10 min. Le PC18 en bloquant le métabolisme de l'AngIII dans le cerveau, augmente sa demie vie d'un facteur 3,9 par rapport aux témoins. Ces résultats confirment que dans le SNC, l'APN est impliquée dans le métabolisme de l'AngIII.

Dans un second temps, nous avons mesuré les taux d'AVP plasmatique par dosage radioimmunologique après injection centrale de PC18. Ainsi, nous avons pu montrer que le PC18 (10-100  $\mu g$ ) seul induit une augmentation dose-dépendante des taux d'AVP plasmatique avec une réponse maximale pour la dose de 100  $\mu g$ . Cet effet stimulateur est inhibé à 74 % par la co-administration d'un antagoniste des récepteurs angiotensinergiques, la saralazine. Ces données montrent que le PC18, en bloquant le métabolisme de l'AngIII, induit une accumulation d'AngIII endogène qui, via les récepteurs angiotensinergiques, stimule la sécrétion d'AVP (**Réaux, De Mota, Zini, Cadel, Fournié-Zaluski, Roques, Corvol, Llorens-Cortès, Neuroendocrinology, 1999, 69 : 370-376**).

#### *2. Les effets des inhibiteurs d'APA et d'APN sur la pression artérielle*

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. Le blocage central de l'APA par l'injection i.c.v. d'EC33 (S-3-amino-4-thio-butyl-sulfonate), induit un effet hypotenseur dose-dépendant plus marqué chez le rat spontanément hypertendu que chez le rat normotendu (effet maximal -30mmHg à 100 µg, durée 4 heures), alors que l'injection par voie i.v. de l'EC33 (45mg/kg) ne modifie pas la PA. **Ces données indiquent que la conversion, dans le cerveau, de l'AngII en AngIII est nécessaire pour induire un effet presseur suggérant que l'AngIII est l'effecteur du SRA cérébral, responsable de l'augmentation de PA.** Pour confirmer cette hypothèse, nous avons étudié les effets sur la PA d'un inhibiteur de l'APN, le PC18 (3-amino-4-thio-méthionine). Le PC18, injecté par voie i.c.v. (60 µg), en provoquant l'accumulation d'AngIII endogène, induit une augmentation de PA. La spécificité d'action du PC18 sur le métabolisme de l'AngIII est démontrée par l'abolition de son effet presseur en présence d'EC33 ou d'un antagoniste des récepteurs AT1.

En conclusion, ces données montrent que l'AngIII est l'un des principaux peptides effecteurs du SRA cérébral, exerçant un effet stimulateur tonique sur le contrôle central de la PA. L'APA, responsable de la formation de l'AngIII cérébrale, pourrait ainsi constituer une cible thérapeutique potentielle justifiant le développement d'inhibiteurs d'APA comme antihypertenseurs à action centrale.

### 3. Travaux en projet

*Recherche d'un inhibiteur d'APA de haute affinité, sélectif, et passant la barrière hématoencéphalique.*

Comme indiqué ci-dessus de nouveaux composés ont été développés et évalués *in vitro* sur différentes enzymes recombinantes. Les produits les plus efficaces, c'est-à-dire ayant une affinité subnanomolaire pour l'APA et présentant une sélectivité par rapport à l'APN, l'endopeptidase neutre et l'enzyme de conversion de l'angiotensine, seront testés *in vivo* par voie i.c.v sur : 1) le métabolisme des angiotensines cérébrales ; 2) la sécrétion de vasopressine ; 3) la pression artérielle.

Pour des inhibiteurs passant la barrière hématoencéphalique, des expériences similaires seront réalisées en injectant, cette fois-ci l'inhibiteur par voie intraveineuse.

## 2. Récepteurs de l'AngII / AngIII de type-1 (AT<sub>1A</sub> et AT<sub>1B</sub>) et de type-2 (AT<sub>2</sub>)

### A - Cartographie cérébrale de l'ARNm du récepteur AT<sub>2</sub> au cours du développement fœtal et néonatal du rat

Une cartographie cérébrale complète des messagers des récepteurs AT<sub>2</sub> au cours du développement fœtal et néonatal du rat (du jour 11 de gestation (E11) au terme (21 jours ou E21), et jusqu'à 28 jours d'âge postnatal) a été réalisée à l'aide de ribosondes spécifiques. L'expression du récepteur AT<sub>2</sub> apparaît à E13.



L'analyse plus détaillée des résultats montre une expression prédominante du récepteur AT<sub>2</sub> au cours du développement cérébral fœtal : à partir du stade E15, on retrouve un marquage particulièrement prononcé dans le noyau hypoglosse, de même que dès E17 dans l'olive inférieure, le thalamus et les noyaux subthalamique, rouge et tegmental pediculo-pontine. Il est à noter que l'intensité du marquage au niveau du noyau hypoglosse et de l'olive inférieure diminue de façon notable en postnatal mais persiste jusqu'à maturité. **Ces résultats suggèrent un rôle pour les récepteurs AT<sub>2</sub> au cours du développement cérébral, aux étapes précoces de maturation et différenciation.** Ils pourraient aussi jouer un rôle modulateur dans la mise en place des fonctions motrices et sensorielles (Nuyt, Lenkei, Palkovits, Corvol, Llorens-Cortès, J. *Comparative Neurol.*, 1999).

### ***B - Identification dans l'antéhypophyse du type cellulaire exprimant les récepteurs AT<sub>1B</sub>***

Par double marquage (hybridation *in situ* / immunohistochimie), nous avons constaté que  $33.9 \pm 1.0$  % des cellules antéhypophysaires expriment le récepteur AT<sub>1B</sub>. Par double marquage, nous avons précisé l'expression prédominante des récepteurs AT<sub>1B</sub> dans les cellules lactotropes ( $78.2 \pm 2.1$  % des cellules exprimant l'ARNm des récepteurs AT<sub>1B</sub>), et une expression plus faible dans les cellules corticotropes ( $18.3 \pm 2.1$  % des cellules exprimant l'ARNm des récepteurs AT<sub>1B</sub>) et une absence d'expression dans les cellules somatotropes, mammosomatotropes, gonadotropes ou thyrotropes. Comme seulement  $53.8 \pm 2.7$  % des cellules lactotropes et  $23.6 \pm 2.8$  % des cellules corticotropes expriment l'ARNm des récepteurs AT<sub>1B</sub>, nos résultats suggèrent une hétérogénéité fonctionnelle de ces deux populations cellulaires vis à vis de leur sensibilité à l'Ang II.

En conclusion, l'effet stimulateur de l'AngII hypophysaire 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.

### ***C - A la périphérie : rôles respectifs des tyrosines kinases, tyrosines phosphatases et MAP kinases sur la réponse calcique induite par l'angiotensine II et l'angiotensine III dans la branche large ascendante corticale (CTAL) de rein de rat***

Nous avons récemment montré que dans le CTAL les réponses calciques induites par l'AngII et l'AngIII sont médiées par le même sous-type de récepteur : AT<sub>1A</sub> (**Kidney Int, sous presse**). Les objectifs de notre présente étude sont 1) de déterminer si les tyrosines kinases (TK) et les MAP kinases sont capables d'influencer la mobilisation du calcium intracellulaire et l'entrée de calcium

induites par l'AngII et l'AngIII, en utilisant des inhibiteurs spécifiques des TK (herbimycine A) et des MAP kinases (PD98059) et 2) d'évaluer l'importance de la phosphorylation des tyrosines dans les réponses calciques induites par l'Ang II et l'AngIII en utilisant un inhibiteur des tyrosines phosphatases : le phénylarsine oxide (PAO). Les mesures de libération de calcium intracellulaire sont réalisées par microfluorimétrie, avec la sonde fura-2.1) Une préincubation en présence d'herbimycine A entraîne une inhibition significative de la réponse calcique induite par 100nM d'AngII ou d'AngIII (en absence ou en présence de calcium externe). Dans ces expériences, les mesures des surfaces calciques indiquent que l'influx calcique est inhibé de  $29 \pm 4 \%$  pour l'AngII et de  $45 \pm 5 \%$  pour l'AngIII. Lorsque les CTAL sont prétraités en présence de PD98059, les réponses calciques induites par 100nM d'AngII ou d'AngIII sont significativement inhibées et ceci, en absence ou en présence de calcium externe. Les mesures des surfaces calciques démontrent clairement que le PD98059 affecte principalement la mobilisation du calcium intracellulaire (AngII :  $76 \pm 9 \%$ , AngIII :  $79 \pm 13 \%$ ). 2) Le PAO produit une augmentation soutenue de calcium. En absence de calcium externe, les valeurs obtenues ne sont pas significativement différentes. L'herbimycine A réduit significativement la réponse induite par le PAO. Cette augmentation de calcium soutenue est complètement réversée par le dithiothreitol, permettant ainsi à l'AngII et à l'AngIII d'induire à nouveau des réponses calciques normales. Ces résultats indiquent donc que les effets du PAO sont complètement réversibles, suggérant que cet inhibiteur n'entraîne pas un découplage permanent du signal induit par l'AngII ou l'AngIII.

En conclusion, ces données montrent que dans le CTAL 1) les augmentations de calcium induites par l'AngII et l'AngIII sont partiellement dépendantes des TK, mais également de MEK, qui peut rétroactivement moduler la mobilisation du calcium intracellulaire et 2) la balance entre les activités tyrosines kinases et tyrosines phosphatases pourraient jouer un rôle important *in vivo* dans la régulation de l'homéostasie du calcium non seulement dans les conditions basales, mais également après stimulation hormonale.

### **3. Recherche de ligands endogènes de récepteurs orphelins**

#### **A - Objectif**

Le développement des techniques de clonage a permis d'isoler un grand nombre de récepteurs couplés aux protéines G (GPCRs) dont le ligand endogène est encore inconnu (récepteurs orphelins). Les GPCRs orphelins constituant d'excellentes cibles thérapeutiques, il devient essentiel d'élucider leurs fonctions via l'identification de leurs ligands endogènes.

#### **B - Travaux réalisés**

Afin d'identifier les ligands endogènes de récepteurs orphelins nous avons développé un nouveau procédé qui met à profit la propriété qu'ont la plupart des

GPCRs de s'internaliser sous l'action de ligands agonistes. Cette méthode consiste 1) à étiqueter un récepteur orphelin avec une protéine autofluorescente (EGFP) ; 2) exprimer ce récepteur à la surface de cellules eucaryotes ; 3) mettre ces cellules en contact avec des fractions HPLC purifiées d'un extrait de tissu ; 4) visualiser et quantifier en microscopie confocale l'internalisation du récepteur qui se concrétise par un déplacement du marquage fluorescent de la membrane de la cellule vers l'intérieur de celle-ci sous la forme de vésicules cytoplasmiques fluorescentes. En réalisant plusieurs étapes de purification et de tests d'internalisation successifs, il devient possible d'isoler la fraction contenant le peptide pur et de séquencer celui-ci. (Dépôt d'un brevet INSERM)

Afin de valider cette approche et de déterminer sa sensibilité, nous avons utilisé des cellules CHO exprimant de façon stable le récepteur NT1 de la neurotensine (NT) couplé à l'EGFP. La NT exogène appliquée sur ces cellules entraîne une internalisation des complexes récepteurs-ligands, dose-dépendante, avec une EC50 de 1 nM. Si l'on expose ces cellules à des fractions purifiées par HPLC d'un extrait de cerveaux de grenouille, on observe une internalisation pour seulement 4 des 120 fractions testées. La présence du ligand endogène du récepteur NT1, la NT, dans ces fractions est confirmée par la production d'inositol-phosphates induite par ces fractions dans les cellules CHO NT1-EGFP et par leur immunoréactivité positive pour la NT. (colls. avec le Lab. d'H. Vaudry, INSERM U413 et le Lab. d'A. Beaudet, Institut McGill, Montréal, Canada).

En conclusion ces travaux démontrent que le procédé d'internalisation décrit ci-dessus est un moyen direct, spécifique, fiable, d'une grande sensibilité (de l'ordre du nanomolaire), permettant d'identifier le ligand endogène d'un récepteur orphelin au sein d'un échantillon de tissu. Ce procédé pourra être, en outre, utilisé comme biosenseur permettant de détecter dans un liquide biologique, la présence d'une substance capable de se lier sur le récepteur.

### **C - Perspectives**

Nous voulons poursuivre ce programme en : 1) améliorant le procédé pour le rendre plus accessible à la routine ; 2) développant une méthode de quantification du procédé d'internalisation ; 3) appliquant cette nouvelle méthodologie à la recherche de ligands endogènes de récepteurs orphelins au sein d'un échantillon de tissu ou d'un liquide biologique.

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

Équipe : E. CLAUSER, C. AUZAN, S. BARDIN, R. COSPEDAL, C. DUGOURD,  
S. MISEREY, C. MONNOT, C. PARNOT

L'activité du groupe au cours de l'année 1998-99 a porté sur l'analyse du fonctionnement moléculaire des récepteurs de l'angiotensine II (AngII) 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), de morphologie (microscopie confocale) et de physiologie cellulaire (étude de la division cellulaire et de divers seconds messagers).

## 1. Les récepteurs aux peptides vasoactifs

Les récepteurs de l'AngII (AT<sub>1</sub> humain, AT<sub>1A</sub>, et AT<sub>1B</sub> de rat, AT<sub>2</sub> de rat), qui nous servent de modèle mais aussi de la vasopressine (V1a, V1b et V2) et de l'endotheline (ETA et ETB) sont des récepteurs hepta-transmembranaires couplés à des protéines G, qui ont été clonées. 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.

\* Nous avons développé plusieurs modèles d'étiquetage du récepteur AT<sub>1A</sub> de rat du fait de 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. Nous avons pu ainsi analyser les déterminants de l'internalisation du récepteur AT<sub>1A</sub> après étiquetage par l'EGFP dans les cellules HEK293 par microscopie confocale et démontrer que les agonistes et antagonistes peptidiques permettent cette internalisation alors que les agonistes et antagonistes non peptidiques ne le permettent pas.

\* 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. Un travail particulier consiste à caractériser les mécanismes et la nature de l'activation de la voie de signalisation PI3kinase/Akt.
- 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.

\* Parallèlement à ces travaux nous nous intéressons aux mécanismes d'activation du récepteur AT<sub>1</sub> et nous souhaitons donc identifier des mutations activant de façon constitutive ce récepteur. La réalisation d'une banque mutationnelle du récepteur AT<sub>1</sub> cloné dans un vecteur inductible et le criblage de cette banque par

un test fonctionnel recherchant cette activation constitutive du récepteur AT<sub>1</sub> est en cours de réalisation. Plusieurs mutations ont déjà été identifiées et leur caractérisation est en cours.

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.

## 2. Récepteur de l'insuline

L'analyse des rapports structure-fonction du récepteur de l'insuline s'est poursuivie par l'étude du rôle du domaine transmembranaire du récepteur dans la transmission du signal.

\* La construction de plusieurs ADNc codant des protéines chimères dont le domaine transmembranaire a été remplacé par les domaines équivalents de plusieurs protéines ou récepteurs membranaires (récepteur EGF, oncoprotéine neu, glycophorine etc..) a été réalisée. La caractérisation fonctionnelle de ces récepteurs mutants est en cours en collaboration avec le groupe de G. CREMEL et P. HUBERT (INSERM U338, Strasbourg). De plus nous avons étudié les conséquences de l'inversion de la séquence du domaine transmembranaire du récepteur de l'insuline dans la biosynthèse, le fonctionnement et la signalisation des formes courte (hIRA) et longue (hIRB) du récepteur. Ce travail en cours de rédaction montre l'absence de conséquence fonctionnelle de cette inversion pour les deux formes du récepteur (C. AUZAN *et al.*, soumis).

\* Enfin et dans le cadre d'une collaboration avec A.F. BURNOL (CRI CNRS, Laboratoire de J. GIRARD à Meudon) nous avons étudié le rôle fonctionnel d'une protéine appelée 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. JEUNEMAÎTRE, A-M. HOUOT, A-P. GIMENEZ-ROQUEPLO, J. CÉLÉRIER, S. DISSE, C. DUFOUR, P-F. PLOUIN

### 1. Génétique moléculaire de l'angiotensinogène

Suite à nos travaux antérieurs montrant l'implication du gène de l'angiotensinogène humain dans l'hypertension artérielle essentielle, nous avons entrepris une

analyse approfondie biochimique des variants moléculaires du gène de l'angiotensinogène identifiés chez l'homme et leur association avec différentes formes d'hypertension artérielle.

L'expression *in vitro* en cellules eucaryotes d'angiotensinogène recombinant 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 qui est à l'origine de l'hétérogénéité de la protéine en migration SDS-PAGE. Nous avons pu également montré la présence d'un pont disulfure entre les Cys 18 et 138 de la protéine mature et l'implication des Cys 232 et 308 dans la formation d'hétéropolymères *in vitro*. La purification de diverses formes d'angiotensinogène recombinant a permis de mettre en évidence la possibilité d'un clivage C-terminal de la molécule, qui s'apparente au clivage observé pour d'autres serpins. Son rôle physiologique putatif et la présence d'une éventuelle sérine protéase clivant l'angiotensinogène sont en cours d'étude, de même que la poursuite du projet de cristallisation de la protéine en collaboration avec les laboratoires Hoffmann-Laroche.

Nous avons également poursuivi l'analyse de la signification *in vivo* du polymorphisme M235T, en particulier en relation avec la prise d'estrogènes. Sur une population faisant l'objet d'un suivi longitudinal, nous avons pu mettre en évidence une association de ce polymorphisme à des taux plasmatiques plus bas de rénine, confirmant l'effet de rétrocontrôle négatif de l'augmentation de production d'angiotensine II lors de l'élévation de l'angiotensinogène chez les patients ayant l'allèle 235T. Cette réadaptation du système rénine angiotensine est encore plus caricaturale après stimulation estrogénique chez des normovolontaires sains. L'effet plus marqué de la stimulation chez les sujets porteurs du génotype TT235 par rapport aux MM235, confirme l'intérêt de ce marqueur.

## **2. Étude des différentes sous-unités du canal Na épithélial amiloride-sensible dans l'HTA essentielle**

Le canal Na sensible à l'amiloride contrôle la réabsorption finale du Na au niveau du tube contourné distal. Il est constitué de trois sous-unités  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  toutes nécessaires à sa fonction. Des délétions portant sur la partie C-terminale des sous-unités  $\beta$  et  $\gamma$  sont responsables d'une augmentation du courant Na au niveau de la cellule tubulaire distale et de formes rares mais caricaturales d'HTA avec inflation hydrosodée et rénine basse (syndrome de Liddle). L'hypothèse que nous avons formulée était celle de la présence de mutations sur l'une ou plusieurs des sous-unités de ce canal Na épithélial dans l'HTA essentielle. Sur le plan moléculaire, la recherche consistait en un screening de chacun des gènes des 3 sous-unités sur plusieurs groupes d'hypertendus d'origine ethnique différente. La fonctionnalité de chacune des mutations potentielles a été ensuite étudiée par injections d'ARNc dans des œufs de Xénopes.

Après avoir déterminé l'organisation de la structure génomique de la sous-unité  $\beta$ , une recherche systématique de mutations nous a permis d'identifier cinq mutations faux-sens dans la partie C-terminale de la sous-unité  $\beta$  sur plus de 500 sujets hypertendus et 300 témoins. Leur fréquence est rare dans la population hypertendue caucasienne mais plus fréquente parmi les sujets d'origine africaine. La mesure fonctionnelle de cette mutation 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 Thr574Met de  $\beta\text{ENaC}$  suggère un rôle possible de ces variations dans l'hypertension artérielle, en particulier dans la population d'origine Africaine. Une augmentation nette de fréquence a été retrouvée chez les hypertendus (8 %) originaire d'Afrique noire et résidant à Londres comparée à celle observée chez les normotendus (3 %). Dans cette étude, ce polymorphisme était associé avec des niveaux de rénine plus bas, suggérant une expansion volémique plus importante chez ces patients. Cependant, les mesures de l'activité courant mesurées par patch-clamp sur des lymphocytes porteurs de mutations à l'état hétérozygote n'ont pas montré de différence significative par rapport à celles obtenues chez des sujets sans mutation.

Un travail similaire à celui effectué sur la sous-unité  $\beta$  a été effectué sur la sous-unité  $\gamma$ . La caractérisation de la structure génomique nous a permis de corriger la structure publiée dans le même temps que notre recherche avec l'addition d'un intron supplémentaire coupant l'exon 10 en deux. Quatre polymorphismes neutres ont été détectés, trois dans le 3<sup>e</sup> exon du gène (T387C, T474C, C549T) et un dans le dernier exon (C1990G). Leurs fréquences étaient identiques chez les hypertendus et les normotendus. Deux mutations rares (594insP et R631H) ont été retrouvées chez 3 sujets hypertendus. Cependant, nous n'avons pas mettre en évidence d'arguments pour une fonctionnalité de ces mutations *in vitro* et *in vivo*. L'ensemble des résultats obtenus sur cette sous-unité sont plus décevants et ne sont pas en faveur de l'implication de cette sous-unité dans l'HTA essentielle.

L'analyse de la sous-unité  $\alpha$  est en cours. Le polymorphisme W493R semble de fréquence équivalente chez 284 sujets hypertendus caucasiens et 182 témoins normotendus (de l'ordre de 4 %). Son expression en œufs de Xénopes n'a pas montré de différence significative du courant généré par rapport à celui obtenu à partir d'une sous-unité sauvage.

### 3. Étude 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

kallicréine-kinine, réponse au sel, sécrétion d'aldostérone, contre-transport Na/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. L'analyse du gène du récepteur de type 1 de l'angiotensine II est en cours, en relation avec ces systèmes.

Nous avons également poursuivi une étude de génétique moléculaire du système kallicréine-kinine. Ce système est constitué d'une cascade enzymatique aboutissant à la génération de peptides vasodilatateurs et natriurétiques, antagonistes du système rénine-angiotensine. Une relation négative existe entre la pression artérielle et le niveau d'excrétion urinaire de kallicréine dont environ 50 % de la variance est génétiquement déterminé. L'étude d'un marqueur microsatellite du kininogène (substrat du système) ne montre pas de liaison génétique avec l'hypertension artérielle essentielle tout venant. La recherche de polymorphismes au niveau du gène de la kallicréine rénale s'est avérée positive. Certains de ces polymorphismes sont associés avec une baisse de l'excrétion urinaire de kallicréine. Leur impact biochimique a pu être analysé en collaboration avec l'U367 de l'Inserm.

#### **4. Analyse d'une forme autosomique dominante d'hypertension artérielle essentielle**

Le syndrome de Gordon (pseudohypoaldostéronisme de type II) est une forme d'hypertension artérielle particulièrement intéressante par sa transmission autosomique dominante, par son profil biologique (hyperkaliémie avec rénine basse) et par son profil thérapeutique (grande sensibilité aux diurétiques thiaziques). L'identification de loci impliqués dans cette maladie pourrait donc ouvrir des voies de recherche très intéressantes dans l'HTA essentielle. Nous avons pu identifier quatre familles françaises dont l'analyse génétique initiale a permis d'exclure une liaison avec les chromosomes 1 et 17, préalablement rapportés dans la littérature comme impliqués dans la pathologie. L'identification d'une famille de 45 individus dont 15 sujets atteints, nous a permis de débiter un screening complet du génome pour tenter d'identifier un 3<sup>e</sup> locus à l'origine de la maladie.

#### **5. Génétique d'autres maladies cardiovasculaires**

Nous avons aussi débuté depuis 3 ans (projet PHRC-94) la collection de familles atteintes de **prolapsus valvulaire mitral idiopathique** (maladie de Bar-



low). 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 avons pu mener à bien **l'identification d'une première localisation de la maladie** par l'analyse de 370 marqueurs répartis sur l'ensemble du génome à partir de 4 grandes familles atteintes. L'intervalle de liaison est actuellement réduit à 7 centimorgans et peut permettre l'analyse de gènes candidats de la région.

**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 ; Projet financé par la Société Française d'Hypertension Artérielle).

## BIBLIOGRAPHIE

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 G.H. 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 colocalized 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., KREGE 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., DONG 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., SWYNGHEDAUW B. and SAMUEL J-L. Cardiac senescence is associated with enhanced expression of angiotensin II receptor subtypes. *Endocrinology* 139 : 2579-2587, 1998.

GERMAIN S, BONNET F, PHILIPPE J, FUCHS S, CORVOL P and PINET F. A novel distal enhancer confers chorionic expression on the human renin gene. *J. Biol. Chem.* 273 : 25292-25300, 1998.

AUBERT J-D, CARNAL B, RICOU J, FIORONI P, JUILLERAT-JEANNERET L and PINET F. Characterization of the enzyme involved in the processing of big endothelin-1 in human lung epithelial cells. *Pulmonary Pharmacol. Therapeut.* 11 : 209-213, 1998.

VAZEUX G., WILK S., WILK E., CORVOL P. and LLORENS-CORTES C. Production and properties of a recombinant soluble form of aminopeptidase A. *Eur. J. Biochem.* 254 : 671-678, 1998.

VAZEUX G., ITURRIOZ X., CORVOL P. and LLORENS-CORTES C. A glutamate residue contributes to the exopeptidase specificity in aminopeptidase A. *Biochem. J.* 334 : 407-413, 1998.

KLINGLER C., ANCELLIN N., BARRAULT MB., MOREL A., BUHLER J-M., ELALOUF J-M., CLAUSER E., LUGNIER C and CORMAN B. Angiotensin II potentiates vasopressin-dependent cAMP accumulation in CHO transfected cells. Mechanisms of cross-talk between AT<sub>1A</sub> and V2 receptors. *Cell. Signal.* 10 : 65-74, 1998.

KASUS-JACOBI A., PERDEREAU D., AUZAN C., CLAUSER E., VAN OBBERGHEN E., MAUVAIS-JARVIS F., GIRARD J. and BURNOL A.F. The Grb14 adaptor affects insulin signaling through a novel phosphotyrosine interacting domain. *J. Biol. Chem.* 273 : 26026-26035, 1998.

MISEREY S. and CLAUSER E Récepteurs de l'angiotensine II : classification, structure et transduction du signal. *Thérapie.* 53, 205-211, 1998.

MISEREY S., CONCHON S., PARNOT C., AUZAN C., MONNOT C., CORVOL P. and CLAUSER E. AT<sub>1</sub> versus AT<sub>2</sub>. *In Endocrinology and Cardiovascular Function.* E. LEVIN I J. NADLER ed. Kluwer Academic Publ. 1998. pp. 99-117.

CLAUSER E. Structure et fonctions moléculaires des récepteurs de l'angiotensine II. *Nephrologie* 19, 403-409, 1998.

BOUDJENNAH L., DALET-FUMERON V. and PAGANO M. Expression of collagenase/gelatinase activity from basement membrane fibronectin: isolation after limited proteolysis of a bovine lens capsule and molecular definition of this thiol-dependent zinc metalloproteinase. *Eur. J. Biochem.* 255 : 246-254, 1998.

1999

LENKEI Z., NUYT A-M., GROUSELLE D., CORVOL P. and LLORENS-CORTES C. Identification of endocrine cell populations expressing the AT<sub>1B</sub> subtype of angiotensin II receptors in the anterior pituitary. *Endocrinology* 140 : 472-477, 1999.

HUBERT C., GASC J-M., BERGER S., SCHUTZ G. and CORVOL P. Effects of mineralocorticoid receptor genes disruption on the components of the renin-angiotensin system in 8-day old mice. *Mol. Endocrinol.* 13 : 297-306, 1999.

MICHAUD A., CHAUVET M-T. and CORVOL P. The N domain of angiotensin I-converting enzyme as assessed by structure-function studies of its highly selective substrate, N-Acetyl-Seryl-Aspartyl-Lysyl-Proline. *Biochem. Pharmacol.* 57 : 611-618, 1999.

CONCHON S., MISEREY S., PARNOT C., MONNOT C., CORVOL P. and CLAUSER E. Several interesting phenotypes of the AT<sub>1</sub> receptor produced by site-directed mutagenesis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 10 : S8-S14, 1999.

KORTH P, BOHLE RM, CORVOL P and PINET F. Cellular distribution of endothelin-converting enzyme-1 in human tissues. *J. Histochem. Cytochem.* 47 : 447-462, 1999.

DIVE V., COTTON J., YIOTAKIS A., MICHAUD A., VASSILIOU S., JIRACEK J., VAZEUX G., CHAUVET M-T., CUNIASSE P. and CORVOL P. RXP407, a phosphinic peptide, is a potent inhibitor of angiotensin I converting enzyme able to differentiate between its two active sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96 : 4330-4335, 1999.

PERSU A., COSCOY S., HOUOT A-M., CORVOL P., BARBRY P. and JEUNEMAITRE X. Polymorphisms of the  $\gamma$  subunit of the epithelial Na<sup>+</sup> channel in essential hypertension. *J. Hypertens.* 17 : 639-645, 1999.

NUYT A-M., LENKEI Z., PALKOVITS M., CORVOL P. and LLORENS-CORTES C. Ontogeny of angiotensin II type 2 receptor mRNA expression in fetal and neonatal rat brain. *J. Comp. Neurol.* 407 : 193-206, 1999.

PELLETIER J., AUZAN C., DAVEAU A., CLAUSER E. and CHEMINEAU, P. Sheep 5HT<sub>2</sub> receptor: partial cloning of the coding sequence and mRNA localization by in situ hybridization in sheep hypothalamus. *Cell Tissue Res.* 295 : 231-239, 1999.

JUNOT C., MÉNARD J., GONZALES M-F., MICHAUD A., CORVOL P. and EZAN E. In vivo assessment of captopril selectivity of angiotensin I-converting enzyme inhibition: differential inhibition of acetyl-ser-asp-lys-pro and angiotensin I hydrolysis. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 289 : 1257-1261, 1999.

## EXPOSÉS, CONGRÈS

**Monsieur Pierre Corvol** a participé aux congrès et réunions suivants : ERCC — Shipol (17-18 octobre 1998) ; 25<sup>e</sup> Anniversaire Groupe Multidisciplinaire de Recherche en Hypertension du CRM — Montréal — Canada (29-30 octobre 1998) ; 11<sup>e</sup> Colloque Biotechnocentre — Seillac (5 novembre 1998) ; Série de conférences aux USA : New Orléans, Jackson (16-21 novembre 1998) ; Journées Hypertension Artérielle — Paris (17-18 décembre 1998) ; Congrès sur les facteurs génétiques de protection vis-à-vis des maladies — Venise — Italie (8 février 1999) ; Quatrième réunion du Réseau Français d'Angiogenèse — Lille (16 et 17 avril 1999) ; XVI<sup>e</sup> Congrès du groupe de Réflexion sur la Recherche Cardiovasculaire — Deauville (22 et 23 avril 1999) ; Journées H.P. Kloz — Endocrinologie Clinique — Paris (29-30 avril 1999) ; Société Internationale d'Hypertension Artérielle — Milan — Italie (11-12 juin 1999).

**Messieurs Jean-Marie Gasc et Hervé Kempf** ont participé aux congrès suivants : au 57<sup>e</sup> Congrès de la Society for Developmental Biology (Palo alto, USA ; 20-25 juin 98). Jean-Marie GASC a participé aux congrès suivants : Troisième Symposium international sur la Maladie de von Hippel-Lindau (Paris ; 16-18 septembre 1998) ; 13<sup>e</sup> Séminaire fondamental de Néphrologie (Marne la Vallée, France ; 15-16 octobre 1998) ; Séminaire Princesse Liliane (Bruxelles, Belgique ; 26-27 octobre 1998).

Hervé KEMPF a participé aux congrès suivants : « Experimental Biology'99, American Physiological Society meeting » (Washington DC, USA, 18-21 avril 1999) présentation orale sur « Angiotensin Receptor(s) and Development in Fowl » ; Antisense 98, Targeting the Molecular Basis of Disease, Londres, Angleterre, 8-9 octobre 1998.

**Mademoiselle Judith Favier** a participé à : la Quatrième réunion du Réseau Français d'Angiogenèse — Lille (16 et 17 avril 1999), présentation orale sur « *Clonage, expression et induction par l'hypoxie du facteur de transcription EPAS1 chez l'embryon de poulet* » ; au XVI<sup>e</sup> Congrès du groupe de Réflexion sur la Recherche Cardiovasculaire — Deauville (22 et 23 avril 1999) présentation orale sur : « *EPAS1, un facteur de transcription impliqué dans l'angiogenèse embryonnaire et adulte* ».

**Séminaires :**

**Monsieur Hervé Kempf** : Département de Pharmacologie (Pr H. Struijker-Boudier), Université de Maastricht, Maastricht, Pays-Bas (6 novembre 1998) : « *Endothelin System in Development* ». Département de Physiologie et de Biophysique (Pr H. Nishimura ; 19 juin 1999), Université du Tennessee, Memphis, Tennessee, États-Unis : « *Endothelin receptors and Development* » ; Département de Biologie Moléculaire, CNRS URA 1947, (Dr M. Buckingham ; 23 mars 99) Institut Pasteur, Paris, France « *Inactivation pharmacologique du récepteur de l'endotheline A de poulet* » ; Séminaire de la Chaire de Médecine expérimentale

au Collège de France (11 mars 1999) : « *Peptides vasoactifs et développement : Le modèle de l'embryon de poulet* »

**Mademoiselle Florence Pinet et son équipe** ont participé aux congrès suivants : 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 1998) ; 80th Endocrine Society Meeting — New Orleans, USA (24-27 juin 1998) ; European Research Conference on Blood Pressure and Cardiovascular Disease — Noordwijkkerout, Hollande (16-18 octobre 1998) ; XVIII<sup>e</sup> Journées de l'hypertension artérielle — Paris (17-18 décembre 1998) ; IX<sup>e</sup> Journées Européennes de la Société Française de Cardiologie — Paris (13-16 janvier 1999) ; Réunion du réseau d'angiogénèse — Lille (16-17 avril 1999) ; Congrès Biologie et Pathologie du cœur et des vaisseaux — Deauville (22-23 avril 1999).

**Monsieur Eric Clauser** a participé aux congrès suivants : AT<sub>1</sub> receptor mutants and signaling. Gordon Research Conference — Ventura California — USA — 15-20 février 1998 ; Angiotensin II receptors and signaling. XVth international congress of Nephrology. Buenos Aires. Argentine. 2-6 mai 1999.

**Madame Claude Tougard** a participé aux congrès suivants : Société Française des Microscopies, Journées Thématiques : « Nouvelles Microscopies pour l'Analyse de Macromolécules », Institut Jacques Monod, Paris, 1-2 octobre 1998 ; Colloque : « La Cellule Endothéliale : du Gène à la Clinique, Approches pluridisciplinaires », Deauville, 19-20 janvier 1999 ; Association Française de Cytométrie, Journée Thématique AFC : « la GFP : Caractéristiques et Applications », Institut Curie, Paris, 5 mars 1999 ; Symposium International : « The Golgi Apparatus : from Structure to Function », CEA, Saclay, 23 mars 1999 ; Congrès Européen de Biologie Cellulaire, Bologne, 8-11 mai 1999.

**Madame Evelyne Vila-Porcile** a participé aux congrès suivants : Société de Neuroendocrinologie Expérimentale, Lille, 2-5 septembre 1998 ; Société Française des Microscopies (SFμ). Journées Thématiques : « Nouvelles Microscopies pour l'Analyse de Macromolécules », Institut Jacques Monod, Paris, 1-2 octobre 1998 ; Cent-Cinquantième de la Société de Biologie, Collège de France, 20 novembre 1998 ; Journée de l'Institut de Biologie du Collège de France, 9 décembre 1998 (Présentation d'un Poster) ; Association Française de Cytométrie. Journée Thématique AFC : « la GFP : Caractéristiques et Applications », Institut Curie, Paris, 5 mars 1999 ; Séminaire « Endothélines », Collège de France, 11-12 mars 1999 ; International Symposium : « The Golgi Apparatus : from Structure to Function », CEA, Saclay, 23 mars 1999.

**Madame Catherine Llorens-Cortes** et son équipe ont participé aux congrès suivants : 9 février 1998 : INSERM U297 (F. Hery) Marseille ; 12 juin 1998 : INSERM U159 (C. Kordon) Paris ; juin 1998 — The Mount Sinai Medical Center — Department of Pharmacology (S. Wilk) New York — USA ; juin 1998 —

Université de Montréal — Faculté de Médecine — Département de Biochimie (P. Crine) — Montréal — Canada ; *Invitation à des Colloques* : 1998 — Société de Biologie — Paris — France — Séance du 12 février 1998 (conférencier) ; XXXVII<sup>e</sup> colloque de la Société de Neuroendocrinologie expérimentale — Lille — France — 2 au 5 septembre 1998 (Président de séance) ; Journée de l'Institut de Biologie — Paris — France — 9 décembre 1998 (conférencier) ; 1999 — Gordon Research Conference on Angiotensin — Oxford — Angleterre — 8, 13 août 1999 (conférencier).

**Monieur Xavier Jeunemaitre** et son équipe ont participé aux congrès suivants : 17th Meeting of the International Society of Hypertension. Amsterdam, juin 1998 ; European Research Council for High Blood Pressure, Noordwijkerhooft, octobre 1998 ; Journées de la Société Française d'HTA, Paris, décembre 1998 ; European Meeting of Hypertension, Milan, juin 1999.

#### ENSEIGNEMENTS

**Monsieur Pierre Corvol** a participé aux enseignements suivants : DEA d'Endocrinologie Moléculaire (Paris XI) ; DEA de Pharmacologie (Paris XI)

**Mademoiselle Florence Pinet** est co-directeur des études du 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, Paris VI, mars 1999 ; DEA d'Endocrinologie et Interactions Cellulaires, Paris XI, avril 1999. Cours dans le cadre du Certificat de Cytologie et Histologie, Université René Descartes, février 1999.

**Madame Catherine Llorens-Cortes** a participé à l'enseignement du C2 pour la Maîtrise des Sciences Biologiques et Médicales et Diplôme d'Université ; Pharmacologie Endocrinienne (Paris VII) ; du DEA de Pharmacologie Moléculaire (B. Roques).

**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). ; Coordinateur d'un projet d'école doctorale Paris VI- Paris VII associant 3 à 4 DEA sur le thème « Physiologie et Physiopathologie » ; Responsable de la direction du département de Biochimie, Biologie Moléculaire et de Biologie cellulaire de la Faculté St Antoine ; Membre élu et vice président de la CSS5 de l'INSERM.

**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 de Maîtrise SBM de Paris VI « Étude des maladies polygéniques », au Certificat C2 de Biologie Moléculaire (Paris V), organisé par le Pr Kaplan, au DEA de Pharmacologie Cardiovasculaire organisé par les Pr Safar et Sassard, au Diplôme Universitaire de Néphrologie Pédiatrique, Hôpital Necker. Enseignement « Génétique de l'hypertension artérielle », Université de Ancone, Italie, octobre 1998. Lecture à la Société Québécoise d'Hypertension Artérielle, Québec, janvier 1999 ; au 21<sup>e</sup> Séminaire de Cardiologie Fondamentale, Paris, mars 1999 ; au séminaire de Génétique Humaine, Dijon, avril 1999.

#### LISTE DES DIPLÔMÉS

##### DEAs

**Sébastien Fuchs** : DEA de Biologie et Pharmacologie de l'Hémostase et des Vaisseaux (Paris VII).

*Régulation de l'expression du gène de la rénine humaine par le calcium intracellulaire.*

**Judith Favier** : DEA de Génétique Moléculaire des Maladies du Développement et de l'Oncogénèse (Paris V).

**EPASI : un facteur de transcription impliqué dans l'angiogenèse embryonnaire et adulte.**

**Sonia Hammami** : DEA d'Endocrinologie et Interactions Cellulaires (Paris XI)  
*Étude de l'enzyme de conversion de l'endothéline dans l'antéhypophyse de rat.*

**Sandra Disse** : DEA de Génétique Humaine (Paris VII) (Pr Buttin).  
*Localisation génétique primaire de la maladie de Barlow*

##### THÈSES

**Stéphane Germain** : Thèse d'Université en Pharmacologie Moléculaire et cellulaire (Paris VI).

*Étude des facteurs transcriptionnels de la rénine humaine.*

**Anne-Paule Gimenez-Roqueplo** : Thèse de Doctorat de l'Université Paris VI, Janvier 1999.

*Structure et fonction de l'angiotensinogène humain : étude des variants naturels et des variants obtenus par mutagenèse dirigée.*

**Zsolt Lenkei** : Thèse de Doctorat de l'Université Paris VI.

*Rôle des récepteurs de l'angiotensine II centraux dans le contrôle du métabolisme hydrosodé et de la pression artérielle.*

**Laziz Boudjennah** : Thèse de Doctorat de l'Université Paris VI.

*Protéolyse des matrices extracellulaires associée à l'invasion tumorale : Caractérisation et isolement d'une nouvelle activité gélatinase de type thimet issue du domaine liant la gélatine de la fibronectine.*