

## Des enzymes sur mesure, rêve ou réalité ?

Peut-on, à partir de la connaissance que nous avons des mécanismes enzymatiques, créer des systèmes artificiels qui présentent des propriétés similaires à celles des enzymes, à savoir spécificité du substrat, accélération de la vitesse de réaction et nombre de cycles catalytiques quasi illimité ? Répondre à cette question est une façon de tester nos connaissances sur la catalyse enzymatique mais également de satisfaire une demande très forte de l'industrie des biotechnologies et de la chimie fine. Ces domaines sont en effet confrontés à des réactions difficiles à réaliser par des voies chimiques conventionnelles et pour lesquelles les enzymes naturelles ne sont pas adaptées ou n'existent tout simplement pas. En particulier, la

création de nouvelles enzymes à activité hydrolytique représente un enjeu important avec des applications très diverses. L'utilisation de protéases est ainsi largement exploitée dans le cadre de l'analyse du protéome et dans le traitement d'affections cardiovasculaires. Dans un tout autre domaine, il a fallu améliorer les lipases dans leur stabilité et pour leur résistance à la protéolyse afin de pouvoir les utiliser dans les lessives et dans un certain nombre de procédés industriels. Enfin, il convient d'ajouter les nombreuses estérases optimisées pour un usage en chimie pharmaceutique. Différentes approches sont aujourd'hui explorées pour créer de nouveaux biocatalyseurs avec des spécificités et des efficacités variées.

### Les anticorps catalytiques, des enzymes produites par le système immunitaire

Parmi les différentes stratégies développées pour créer de nouveaux biocatalyseurs, les anticorps catalytiques occupent une place de choix depuis 1986 avec un très large spectre de réactions catalysées [1, 2]. Cette approche consiste à préparer des anticorps monoclonaux dirigés contre des molécules stables, mimes de l'état de transition de la réaction que l'on souhaite catalyser (figure 1). Les anticorps les plus affins pour ces analogues de l'état de transition sont capables de catalyser la réaction correspondante avec des facteurs d'accélération par rapport à la réaction spontanée de l'ordre de  $10^3$  à  $10^4$ . A titre de compa-

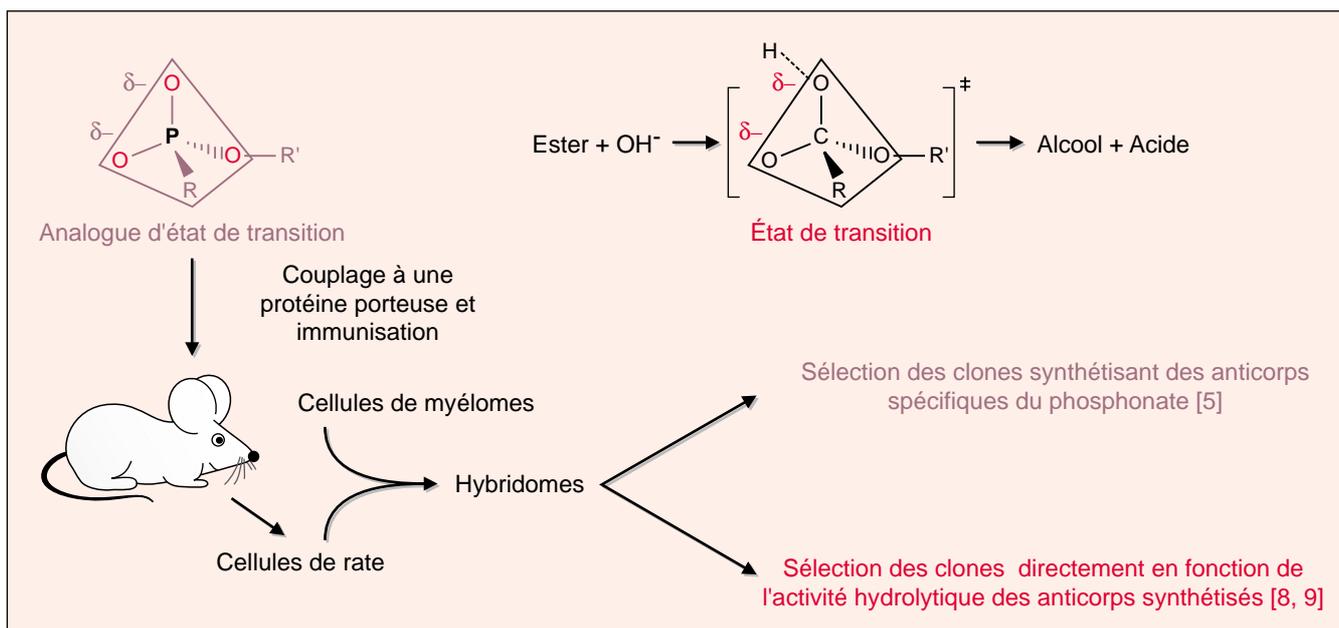


Figure 1. **Principe d'obtention d'anticorps catalytiques à activité estérase.** Les anticorps sont engendrés contre des phosphonates qui sont des mimes de l'état de transition de la réaction d'hydrolyse d'ester. Après une étape de fusion, les hybridomes peuvent être criblés en fonction de l'affinité pour ces mimes de l'état de transition ou directement pour l'activité catalytique. ‡ : état activé et transitoire.

raison, les facteurs d'accélération mesurés pour les enzymes s'échelonnent entre  $10^6$  et  $10^{17}$  [3]. Les applications des anticorps catalytiques les plus prometteuses à ce jour se trouvent dans le domaine de la synthèse asymétrique en chimie. Pour certaines réactions stéréospécifiques, de telles accélérations permettent d'envisager l'obtention d'excès énantiomériques supérieurs à 98 % parfois difficilement accessibles par les voies de synthèse classiques [4].

La détermination de la structure tridimensionnelle d'anticorps sélection-

nés pour leur affinité pour des phosphonates et présentant des activités de type estérase a permis récemment de comparer les mécanismes catalytiques proposés par le système immunitaire à ceux des estérases naturelles [5-7]. Ces dernières présentent des mécanismes catalytiques relativement complexes au cours desquels on observe à la fois une stabilisation du groupement oxyanion de l'état de transition et la participation concertée de plusieurs acides aminés lors de l'attaque nucléophile de la liaison ester. Le mécanisme de la plupart des

anticorps catalytiques à activité hydrolytique est relativement plus simple que celui observé pour les estérases naturelles: il semble ne faire intervenir que la stabilisation de l'oxyanion, l'attaque nucléophile de la liaison ester s'effectuant par une molécule du solvant. Cette différence de mécanisme semble être à l'origine de la différence d'efficacité des anticorps catalytiques et des enzymes pour une réaction donnée (figure 2).

Une des limites de cette approche réside certainement dans le fait que les analogues d'état de transition ne

Substrat(s)	Produit(s)		$K_{cat}/K_m$ (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	$K_{cat}/K_{non\ cat}$	Références
		Estérase	$4,0 \cdot 10^7$	$1,2 \cdot 10^{12}$	[3]
		Anticorps estérase	$2,1 \cdot 10^2$	$1,3 \cdot 10^5$	[9]
		Aldolase	$1,5 \cdot 10^4$ ***	$4 \cdot 10^{13}$	[10]
		Anticorps aldolase	$3,8$ ***	$1 \cdot 10^9$	[10]
		Subtilisine	$2,4 \cdot 10^5$	$4 \cdot 10^9$	[15]
		Subtiligase	$1,8 \cdot 10^{4**}$	nd ***	[15]
		Papaïne	$4,6 \cdot 10^5$	$>10^9$	[16]
		Nitrile hydratase	$4,4 \cdot 10^3$	$3,5 \cdot 10^5$	[16]
		Cyclophiline	$1,5 \cdot 10^7$	$4,6 \cdot 10^5$	[3]
		Cyproase	$1,6 \cdot 10^3$	$8 \cdot 10^8$	[18]

Figure 2. **Comparaison des efficacités catalytiques des enzymes et des biocatalyseurs.** Dans un mécanisme simple de Michaelis-Menten,  $k_{cat}$  est la constante cinétique de conversion du complexe enzyme-substrat vers le complexe enzyme-produit et  $K_m$  est la constante de dissociation apparente du complexe enzyme-substrat;  $k_{non\ cat}$  est la constante cinétique de la réaction spontanée en absence d'enzymes ou de biocatalyseurs. \* Concentration en aldol donneur fixée à 5 % v/v. \*\* Concentration en amide fixée à 3,1 nM. \*\*\*  $K_{cat}$  de la subtilisine sauvage 500 fois plus faible que la subtiligase.

sont pas des mimes parfaits de l'état de transition de la réaction que l'on souhaite catalyser. Les premières techniques de crible de ces anticorps, uniquement fondées sur le critère d'affinité pour l'antigène utilisé, laissent la possibilité de passer à côté de catalyseurs plus efficaces bien que ne présentant pas la meilleure affinité pour ces analogues d'état de transition. Afin d'éviter ce biais, des méthodes de cribles ont été développées, fondées sur la mesure directe de l'activité catalytique de l'ensemble des milliers d'hybridomes obtenus après immunisation [8]. La structure tridimensionnelle des trois anticorps à activité estérase les plus efficaces isolés par ce type de crible montre que ces anticorps utilisent le même mécanisme de stabilisation des oxyanions de l'état de transition que les anticorps obtenus par les autres cribles. De façon surprenante, pour tous ces anticorps, les acides aminés impliqués dans la catalyse sont de nature identique et se superposent parfaitement en termes de structure [9]. Ces résultats suggèrent que le répertoire immunitaire dirigé contre un analogue d'état de transition n'est capable de proposer qu'un nombre limité de solutions catalytiques pour une réaction comme l'hydrolyse d'ester.

Afin de se rapprocher des enzymes dont le mécanisme met en jeu des acides aminés nucléophiles dans un grand nombre de réactions, une approche différente a été proposée. Elle consiste à utiliser lors de l'immunisation, à la place d'analogues d'état de transition, des molécules chimiquement réactives qui sélectionnent préférentiellement les anticorps qui possèdent des acides aminés nucléophiles avec lesquels elles peuvent former un complexe covalent [10]. Cette approche a été utilisée avec succès pour créer des activités nouvelles de type aldolase. Les anticorps sélectionnés possèdent une lysine nucléophile au niveau de leur site actif et présentent un mécanisme et une efficacité similaires à l'enzyme naturelle qui est impliquée dans la glycolyse [11]. Ces anticorps présentent un intérêt biotechnologique certain car ils catalysent un spectre de réactions bien plus large que l'enzyme naturelle.

### Faire évoluer *in vitro* des enzymes naturelles...

Les avancées spectaculaires réalisées dans les domaines de la mutagenèse dirigée et aléatoire et de la détermination des structures tridimensionnelles par RMN ou cristallographie rendent aujourd'hui possible le développement de l'ingénierie d'enzymes sur des bases rationnelles. Pour « redessiner » le site enzymatique d'une enzyme, il est indispensable de bien connaître son mécanisme catalytique et de disposer de sa structure tridimensionnelle, éventuellement complexée à des intermédiaires de la réaction. A partir de la structure, plusieurs stratégies ont été explorées : modification de un/plusieurs résidu(s) pour augmenter la catalyse, modification du site de liaison du substrat pour changer la spécificité de l'enzyme, ou encore modification de résidus ne participant ni à la catalyse, ni à la reconnaissance du substrat, dans le but de changer les propriétés de stabilité et/ou de solubilité de l'enzyme (réaction en présence de solvants organiques, à pH acide ou basique...).

Les protéines modifiées de manière à être plus stables sont nombreuses (subtilisine, lysozyme, phospholipase A2 [12]). La *para*-nitrobenzyle estérase constitue un exemple intéressant d'enzyme modifiée pour répondre à une exigence précise dans la synthèse organique des céphalosporines [13]. Après plusieurs étapes de mutagenèse aléatoire et de criblage, le groupe de Frances Arnold au Caltech a dirigé l'évolution d'une estérase de manière à catalyser la déprotection d'intermédiaires *p*-nitrobenzyle ester de ces antibiotiques en présence de 15 %-30 % de diméthylformamide. L'utilisation de cette enzyme permet d'éliminer une étape de déprotection en présence de zinc qui pose des problèmes en termes de recyclage des déchets.

Les exemples de création d'activités enzymatiques complètement nouvelles sont encore très peu nombreux, en dépit des multiples approches qui ont été développées. L'une d'entre elles consiste à engendrer, à partir du gène d'une protéine, une banque de variants par mutagenèse aléatoire et à les cribler pour

l'activité recherchée. Cette technique a permis, par exemple, de sélectionner des variants anticoagulants à partir de la thrombine [14]. L'évolution des connaissances en matière de mécanismes et de structures des protéines permet d'envisager désormais une approche plus ambitieuse qui consiste à introduire une nouvelle activité enzymatique dans une protéine à partir de l'analyse rationnelle de sa structure tridimensionnelle. Les deux réalisations les plus significatives dans ce domaine sont la création d'une ligase à partir de la subtilisine [15] et d'une nitrile hydratase à partir de la papaïne [16] (*figure 2*). Dans les deux cas, le site enzymatique existant a été en quelque sorte « détourné » de manière à effectuer une réaction chimiquement proche. Le groupe de J.A. Wells à Genentech a converti une sérine protéase, la subtilisine BPN', en ligase en changeant le résidu catalytique Ser<sup>221</sup> en cystéine et Pro<sup>225</sup> en alanine [15, 17]. Cette nouvelle enzyme nommée « subtiligase » permet de relier des fragments peptidiques avec des rendements de couplage supérieurs à ceux obtenus par la plupart des techniques chimiques classiquement utilisées, sans l'utilisation de groupements activateurs ou de préassociation des fragments à assembler. Le couplage de peptides synthétiques sur une protéine ou un fragment de protéine représente une technique puissante pour introduire des acides aminés non naturels dans les chaînes protéiques à des fins d'études fonctionnelles/structurales ou d'ingénierie d'enzymes. En outre, cette technique ouvre la voie à la synthèse peptidique de protéines inaccessibles de manière recombinante car toxiques pour l'hôte d'expression. La nitrile hydratase a été conçue à partir d'une cystéine protéase, la papaïne, en modifiant le site actif de manière à effectuer une réaction d'hydrolyse, chimiquement proche de la réaction protéolytique naturelle [16]. Pour ce faire, un résidu acide a été introduit dans le site actif dans une position appropriée pour pouvoir servir de donneur de proton à l'azote du nitrile. Le nitrile est d'abord converti en une amide qui peut elle-même être hydrolysée en acide. Cette enzyme offre une alter-

native intéressante aux méthodes chimiques classiques qui se font dans des conditions drastiques.

### Une nouvelle voie : l'importation d'une machinerie catalytique au sein d'une protéine [18]

Une nouvelle approche dans la conception de mimes enzymatiques a été récemment proposée. Elle repose sur l'idée que l'on peut créer une activité totalement nouvelle au sein d'une protéine qui en est dépourvue en y important la machinerie catalytique adaptée.

Les endoprotéases coupant sélectivement au niveau d'un acide aminé unique sont particulièrement utilisées dans le séquençage et la cartographie des protéines. La majorité des protéases commercialisées coupent des liaisons peptidiques de façon peu ou non spécifique. Alors qu'il existe vingt acides aminés différents, on ne compte que 4 ou 5 endoprotéases strictement spécifiques. L'enjeu de ce travail était l'obtention d'une endoprotéase spécifique de la liaison peptidyle-prolyle (X-Pro). Un mécanisme fréquent chez les hydrolases repose sur une triade catalytique, composée des trois acides aminés Sérine (Ser), Histidine (His) et Aspartate (Asp). Ces trois résidus adoptent une géométrie spatiale très précise bien que les structures qui les portent soient différentes [19]. En effet, les protéases, dites protéases à sérine comme la subtilisine, la trypsine ou différentes carboxypeptidases possèdent des spécificités de substrat et des architectures fondamentalement différentes mais agissent toutes par un mécanisme qui met en jeu cette triade catalytique (figure 3). On retrouve également ce motif catalytique dans un certain nombre d'estérases et de lipases. Le mécanisme de cette triade est particulièrement bien connu, peut-être un des plus étudiés à ce jour (figure 4).

La cyclophiline est une enzyme dépourvue d'activité hydrolytique, qui catalyse l'isomérisation *cis-trans* des liaisons X-Pro des protéines et possède donc un site de liaison spécifique des chaînes peptidiques contenant une proline [20]. La structure tridimensionnelle de son site actif est

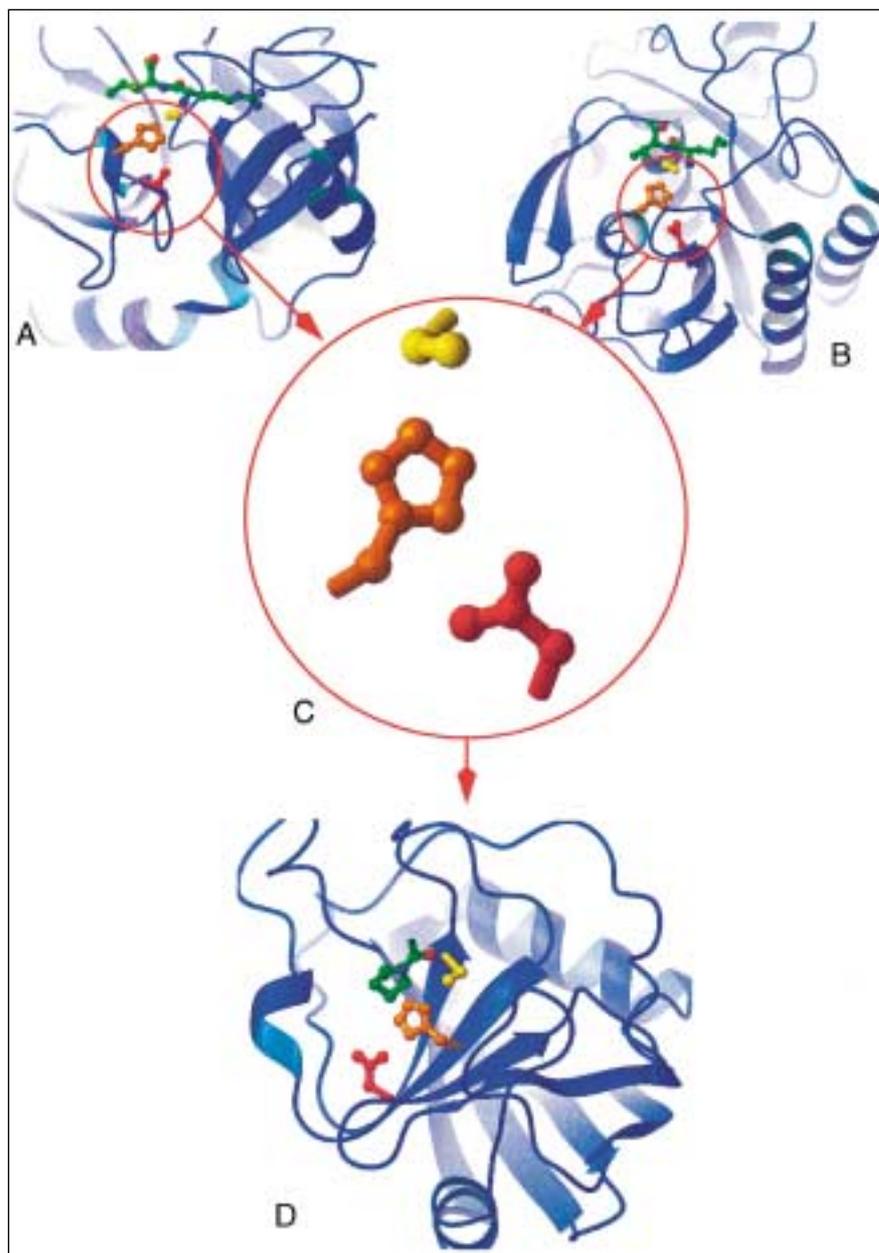


Figure 3. **Structure de la triade catalytique dans les protéases à sérine.** Structures 3D de la trypsine (A) et de la subtilisine (B) complexées avec des inhibiteurs naturels (vert). La triade catalytique (C) constituée des acides aminés sérine (jaune), histidine (orange) et aspartate (rouge) est conservée dans ces deux enzymes en dépit d'un repliement général différent. (D) Modèle du site actif de la cyclophiline après importation de la triade catalytique par mutagenèse dirigée.

connue à la fois dans l'état libre et complexé avec des peptides ([21] pour une revue). La première partie de l'étude a consisté à analyser les différentes structures de cyclophiline afin d'identifier les positions susceptibles de recevoir la première compo-

sante de la triade catalytique, la sérine. Quatre positions ont été retenues dans un rayon relativement large autour de la liaison peptidique afin de tenir compte d'éventuels réarrangements du site actif de la cyclophiline après mutation. Deux de

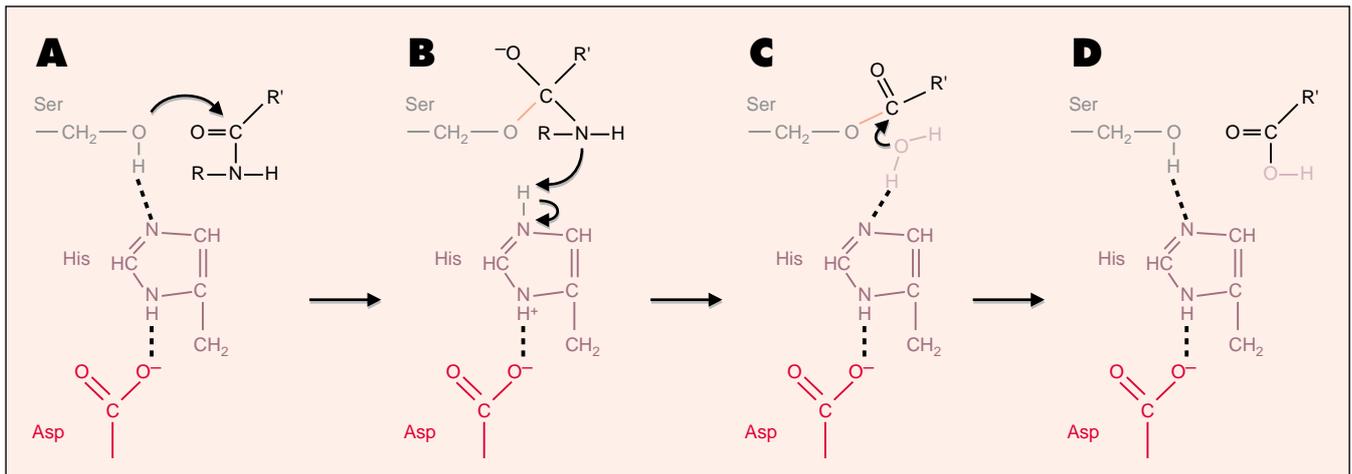


Figure 4. **Mécanisme catalytique de la triade catalytique.** **A.** Attaque nucléophile de la sérine sur le carbone du carbonyle de la liaison peptidique et déprotonation de la sérine par l'histidine. **B.** Stabilisation de l'histidine chargée positivement par l'aspartate et coupure de la liaison peptidique. **C.** Attaque nucléophile d'une molécule d'eau sur l'acyle lié de façon covalente à l'enzyme et **(D)** relargage du produit.

ces mutations Ala91Ser et Gln56Ser présentent une activité hydrolytique significative sur un dérivé chromophorique du peptide alanine-proline. Le mutant Ala91Ser accélère l'hydrolyse du dipeptide d'un facteur  $10^7$ . Pour comparer les résultats obtenus avec des protéases naturelles, le facteur d'accélération observée pour le mutant de la subtilisine dont l'histidine et l'aspartate de la triade catalytique ont été mutés en alanine est de l'ordre de  $10^4$  [22]. Cela suggère un positionnement particulièrement efficace de la sérine introduite dans la cyclophiline vis-à-vis du carbonyle de la liaison à hydrolyser.

Les mutations consécutives en histidine et en aspartate ont été effectuées, tout en respectant autant que possible les critères d'angles et de distances de la triade catalytique canonique (figure 3). Des mutations semi-conservatives ont pu être réalisées sur les acides aminés Phe 104 et Asn 106. Le triple mutant Ala91Ser – Phe104His – Asn106Asp, appelé cyproase, présente une activité hydrolytique extrêmement élevée ( $k_{cat}/K_m = 0,7 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) pour une enzyme conçue en laboratoire, proche de celle mesurée pour des protéases naturelles (figure 2). Cette nouvelle enzyme fonctionne-t-elle comme les protéases à sérine? Deux expériences effectuées classiquement pour les pro-

téases semblent l'indiquer. L'utilisation d'un réactif chimique spécifique des nucléophiles inactive en quelques secondes la cyproase; ce résultat conforte l'hypothèse selon laquelle la sérine introduite dans le site actif relativement hydrophobe de la cyclophiline a un fort caractère nucléophile. La mesure des constantes michaeliennes,  $k_{cat}$  et  $K_m$ , de la cyproase en fonction du pH révèle la titration d'un acide aminé de pKa égal à 6,5 en accord avec la participation de l'histidine introduite en tant que base. Des études cinétiques supplémentaires et la caractérisation de la structure tridimensionnelle de la cyproase sont actuellement en cours afin de préciser son mécanisme.

L'activité de l'enzyme ainsi créée a été testée sur une protéine. L'analyse, par séquençage et spectrométrie de masse, des produits de coupure obtenus confirme la spécificité de coupure en amino-terminal des prolines et la faible spécificité pour les résidus situés en amont et en aval. La cyproase est donc non seulement une endopeptidase mais aussi une endoprotéase. Or, la proline est un acide aminé particulièrement intéressant car relativement peu abondant et souvent situé à la jonction des structures secondaires et des domaines des protéines. Les résultats obtenus permettent d'envisager l'uti-

lisation de cette nouvelle enzyme pour le séquençage et la cartographie des protéines, avec des extensions possibles dans le domaine du diagnostic. Des applications pourraient également se dessiner dans le traitement des produits alimentaires (correction de l'amertume des produits laitiers et des jus de fruits).

## Perspectives

D'autres protéases très spécifiques pourraient être prochainement créées suivant cette même méthode de greffe de motifs catalytiques. L'analyse tridimensionnelle des sites actifs de protéines complexées avec leur ligand naturel ouvre en effet de nombreuses perspectives de création d'activités hydrolytiques ou de ligation spécifiques. D'un point de vue fondamental, cette méthode représente une voie unique pour comprendre une des énigmes de l'évolution des enzymes: la sélection naturelle d'un nombre très restreint de motifs catalytiques en dépit de la grande variété de substrats et des structures tridimensionnelles des protéines. Plus concrètement, cette approche devrait pouvoir fournir dans un avenir proche des solutions enzymatiques originales aux problèmes rencontrés dans les secteurs pharmaceutique, diagnostique et thérapeutique ■

**Jean-Baptiste Charbonnier**  
**Mireille Moutiez**  
**Éric Quéméneur**

CEA, Département d'ingénierie et d'études  
des protéines, Bâtiment 152, CE Saclay,  
91191 Gif-sur-Yvette Cedex, France.

\* **ABRÉVIATIONS** \*

**Ser** : sérine.  
**His** : histidine.  
**Asp** : aspartate.  
**Asn** : asparagine.  
**Gln** : glutamine.  
**Ala** : alanine.  
**Phe** : phénylalanine.  
**Pro** : proline.  
**RMN** : résonance magnétique  
nucléaire.

**TIRÉS À PART**

E. Quéméneur.

**RÉFÉRENCES**

1. Lerner RA, Benkovic SJ, Schultz PG. At the crossroads of chemistry and immunology: catalytic antibodies. *Science* 1991; 252: 659-67.
2. Hua TD, Fulcrand-Rolland V, Lefranc MP, Weill M. Anticorps catalytiques. *Med Sci* 1994; 10: 672-8.
3. Radzicka A, Wolfenden R. A proficient enzyme. *Science* 1995; 267: 90-3.
4. Kirby AJ. The potential of catalytic antibodies. *Acta Chem Scand* 1996; 50: 203-10.

5. Charbonnier JB, Carpenter E, Gigant B, Golinelli-Pimpaneau B, Eshhar Z, Green BS, Knossow M. Crystal structure of the complex of a catalytic antibody Fab with a transition state analog: structural similarities in esterase-like catalytic antibodies. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 11721-5.

6. Gigant B, Charbonnier JB, Eshhar Z, Green BS, Knossow M. X-Ray structures of a hydrolytic antibody and of complexes elucidate catalytic pathway from substrate binding and transition state stabilization through water attack and product release. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 7857-61.

7. MacBeath G, Hilvert D. Hydrolytic antibodies: variations on a theme. *Chem Biol* 1996; 3: 433-45.

8. Tawfik DS, Green BS, Chap R, Sela M, Eshhar Z. CatELISA: a facile general route to catalytic antibodies. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 373-7.

9. Charbonnier JB, Golinelli-Pimpaneau B, Gigant B, Tawfik DS, Chap R, Schindler DG, Kim SH, Green BS, Eshhar Z, Knossow M. Structural convergence seen in the active sites of a family of catalytic antibodies. *Science* 1997; 275: 1140-2.

10. Wagner J, Lerner RA, Barbas III CF. Efficient aldolase catalytic antibodies that use the enamine mechanism of natural enzymes. *Science* 1995; 270: 1797-800.

11. Barbas III CF, Heine A, Zhong G, Hoffmann T, Gramatikova S, et al. Immune versus natural selection: antibody aldolases with enzymic rates but broader scope. *Science* 1997; 278: 2085-92.

12. Shaw A, Bott R. Engineering enzymes for stability. *Curr Opin Struct Biol* 1996; 6: 546-50.

13. Moore JC, Arnold FH. Directed evolution of a *para*-nitrobenzyl esterase for aqueous-organic solvents. *Nat Biotechnol* 1996; 14: 458-67.

14. Gibbs CS, Coutré SE, Tsiang M, Li WX, Jain AK, et al. Conversion of thrombin into an anticoagulant by protein engineering. *Nature* 1995; 378: 413-6.

15. Abrahmsen L, Tom J, Burnier J, Butcher KA, Kossiakoff A, Wells JA. Engineering subtilisin and its substrates for efficient ligation of peptide bonds in aqueous solution. *Biochemistry* 1991; 30: 4151-9.

16. Dufour E, Storer AC, Ménard R. Engineering nitrile hydratase activity into a cysteine protease by a single mutation. *Biochemistry* 1995; 34: 16382-8.

17. Chang TK, Jackson DY, Burnier JP, Wells JA. Subtiligase: a tool for semisynthesis of proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 12544-8.

18. Quéméneur E, Moutiez M, Charbonnier JB, Ménez A. Engineering cyclophilin into a proline-specific endopeptidase. *Nature* 1998; 391: 301-4.

19. Wallace AC, Laskowski RA, Thornton JM. Derivation of 3D coordinate templates for searching structural databases: application to Ser-His-Asp catalytic triads in the serine proteinases and lipases. *Protein Sci* 1996; 5: 1001-13.

20. Fischer G, Wittmann-Liebold B, Lang K, Kiefhaber T, Schmid FX. Cyclophilin and peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase are probably identical proteins. *Nature* 1989; 337: 476-8.

21. Galat A, Metcalfe SM. Peptidylproline *cis/trans* isomerases. *Prog Bioph Mol Biol* 1995; 63: 69-119.

22. Carter P, Wells JA. Dissecting the catalytic triad of a serine protease. *Nature* 1988; 332: 564-8.



## 6<sup>e</sup> Symposium du

Groupe Coopératif de Transplantation d'Île-de-France – GCIF

### LE FUTUR DE LA TRANSPLANTATION ET SES ALTERNATIVES

Vendredi 19 juin 1998

Ministère de l'Éducation nationale de la Recherche et de la Technologie - Carré des Sciences - 1, rue Descartes - 75005 Paris

#### PROGRAMME

**Modérateurs : D. Houssin - H. Kreis**

Histoire de la Transplantation  
P. Bourget (Paris)

Progrès récents et défis des allogreffes  
P. Morris (Oxford, GB)

**Modérateurs : B. Charpentier - B. Malassagne**

La tolérance aux allogreffes : Un espoir réel ?  
M. Goldman (Bruxelles)

Les barrières immunologiques aux xéno-greffes

B. Weill (Paris)

Les barrières non immunologiques aux xéno-greffes

C. Hammer (Munich-Allemagne)

**Modérateurs : Y. Calmus - D. Loisançe**

Alternatives à la transplantation cardiaque  
A. Pavie (Paris) - D. Brodaty (Paris)

Supports hépatiques bio-artificiels

D. Samuel (Villejuif)

**Modérateurs : J.F. Bach - B. Barrou**

Perspectives en greffes d'îlots pancréatiques  
P.Y. Benhamou (Grenoble)

Manipulations génétiques appliquées à la transplantation

A. Mignon (Paris)

#### Renseignements et inscriptions :

Pr LANG - Service de Néphrologie - Hôpital Henri-Mondor, 51, avenue du Maréchal-de-Lattre-de-Tassigny - 94000 Créteil  
Tél. : 01 49 81 24 53 - Fax : 01 49 81 24 51