médecine/sciences 1996 ; 12 : 609-13

Le monde des récepteurs

Ce numéro de* médecine/sciences *illustre, une fois de plus, la complexité du monde des récepteurs, molécules frontières informant les cellules des messages de l'extérieur. Le pouvoir informatif de ces messages est amplifié considérablement par la combinaison de ligands multiples pour un même récepteur, de récepteurs multiples pour un même ligand, d'hétérodimérisation des récepteurs… et parfois des ligands, et d'interconnexions entre les systèmes de transmission intracellulaire des signaux issus des récepteurs. Chaque semaine, de nouveaux ligands (par exemple l'angiotensine IV) et de nouveaux récepteurs (par exemple AT_4) sont identifiés. Leur caractérisation pharmacologique et biochimique ne permet pas toujours de lever les ambiguïtés sur leurs réelles fonctions physiologiques dont la compréhension exige souvent d'avoir recours aux expériences d'invalidation génique par recombinaison homologue : leurs résultats, parfois attendus (inactivation du récepteur de l'insuline) et, d'autres fois, surprenants (inactivation des gènes des récepteurs de l'endothéline), apportent toujours des éléments d'information fondamentaux pour la connaissance de systèmes si souvent impliqués dans des maladies humaines et cibles si évidentes des médicaments d'aujourd'hui et de demain.

L'angiotensine IV : une nouvelle hormone du système rénine-angiotensine

L'intérêt nouveau suscité par la découverte d'agents sélectifs permettant de distinguer différents types de récepteurs de l'angiotensine II (AngII) a entraîné une réévaluation des différentes composantes du système rénine-angiotensine *(figure 1)*. Ce système joue un rôle très important dans la régulation de la fonction cardiovasculaire et de l'équilibre électrolytique. L'élément actif du système rénine-angiotensine est l'octapeptide AngII (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe) qui contracte les muscles lisses de la paroi vasculaire, augmente la force de contraction du cœur, stimule la sécrétion d'aldostérone et module la filtration glomérulaire. L'AngII est aussi reconnue comme un facteur de croissance pour divers types cellulaires incluant les fibroblastes, les cellules du cortex surrénalien, les myocytes cardiaques et les cellules du muscle lisse vasculaire. Tous les effets de l'AnglI sont compatibles avec un rôle de maintien de la pression artérielle et de conservation du volume sanguin. Le précurseur de l'AngII est l'angiotensinogène, une globuline plasmatique provenant majoritairement du foie. L'angiotensinogène est clivé par la rénine pour produire le décapeptide inactif angiotensine I. L'angiotensine I est clivée par l'enzyme de conversion de l'angiotensine, une métalloprotéase qui hydrolyse le dipeptide His-Leu pour produire l'AngII. La régulation du système se fait à l'étape de la sécrétion de la rénine par les cellules de l'appareil juxtaglomérulaire qui répondent, soit à une baisse de pression dans l'artériole afférente du glomérule rénal, soit à une diminution de la concentration de Na^+ dans le tubule distal, ou encore à une stimulation provenant du système nerveux sympathique. Jusqu'à tout récemment, l'AngII et son fragment angiotensine III (AngIII) produit du clivage de l'AngII par l'aminopeptidase A étaient considérés comme les seuls peptides actifs du système rénine/angiotensine. Les fragments plus courts que l'heptapeptide AngIII étaient considérés comme des composés biologiquement inactifs, n'ayant aucune importance physiologique. Cette présomption était fondée sur l'incapacité des fragments de produire les effets classiquement produits par l'AngII. Des résultats récents suggèrent toutefois que certains fragments de l'AngII peuvent produire des effets qui ne sont pas reliés directement aux effets typiques de l'AngII. En effet, chez le rat, l'injection intracérébro-ventriculaire de l'heptapeptide (1-7) de l'AngII a causé une excitation neuronale et la libération de vasopressine [1] alors que l'hexapeptide (3-8) de l'AngII a amélioré les processus reliés à l'apprentissage et à la mémoire [2].

Le développement d'analogues non peptidiques et sélectifs de l'AngII a permis de distinguer deux types de récepteurs de l'AngII : le type AT_1, reconnu sélectivement par le composé L158,809 [3, 4] et le type AT_2 reconnu sélectivement par le composé PD 123319 [5]. Le récepteur AT_1 est responsable de la majorité des effets connus de l'AngII. C'est un récepteur possédant une topologie à sept domaines transmembranaires qui, par l'intermédiaire de protéines G, active la phospholipase C et inhibe l'adénylyl cyclase. Des travaux plus récents démontrent également que le récepteur AT_1 active la MAP *(mitogen activated protein)* kinase [6] la pro-

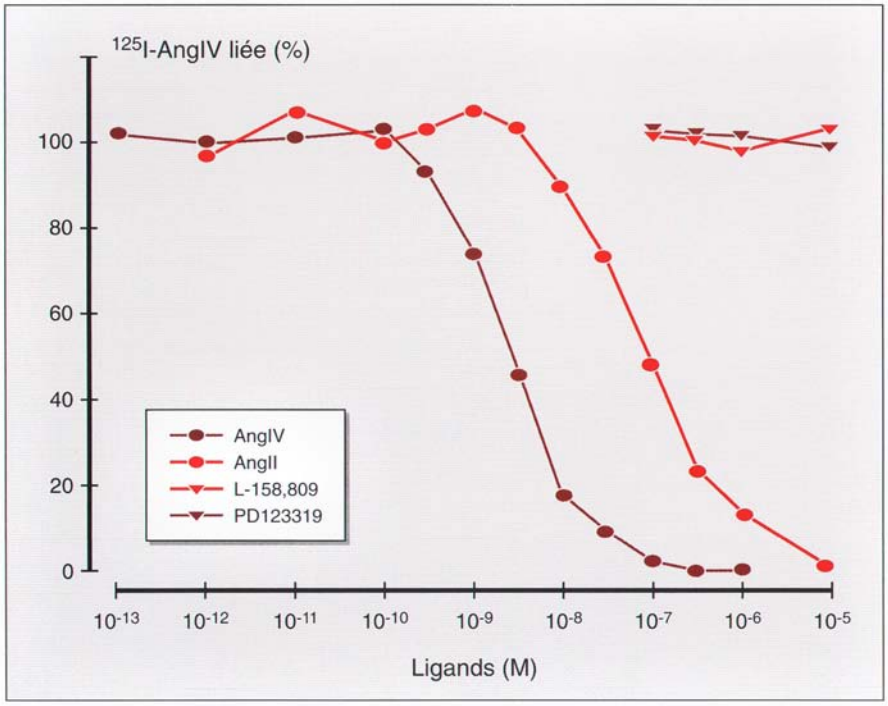

Figure 1. ***Principales composantes du système rénine-angiotensine.***

téine tyrosine kinase Jak_2 [7] et la protéine kinase p70 S6 [8], trois voies de signalisation possiblement responsables du rôle de l'AngII dans la croissance et la différenciation cellulaire. Les fonctions du récepteur AT_2 sont restées assez énigmatiques. Les souris transgéniques déficientes en récepteurs AT_2 ont des comportements anormaux, à type de diminution de la prise de boisson après déshydratation et réduction de l'activité locomotrice. On a noté aussi chez ces animaux une élévation de la pression artérielle, ce qui permet de penser que les récepteurs AT_1 et AT_2 ont des effets opposés, respectivement hypertenseurs et hypotenseurs *(m/s n° 1, vol. 12, p. 122).*

L'utilisation des analogues non peptidiques de l'AngII a aussi permis de mettre en évidence dans différents tissus de nouveaux types de récepteurs qui ne reconnaissent ni le L-158,809 ni le PD 123319 et qui ne correspondent donc ni au type AT_1 ni au type AT_2. Selon ce critère nous avons récemment observé la présence d'un nouveau site de liaison dans le cortex surrénalien bovin [9] et sur les cellules endothéliales d'aorte de bœuf [10]. Sur les cellules endothéliales, paradoxalement, la liaison du ^{125}I-AngII était pratiquement nulle dans des conditions où la dégradation de l'AngII était ralentie par des inhibiteurs des protéases. Ces résultats inattendus suggéraient qu'un métabolite de l'AngII, plutôt que l'AngII elle-même, interagissait avec ces sites de liaison. La récupération du ligand radioactif associé aux cellules endothéliales et son analyse par chromatographie liquide à haute performance ont révélé une coélution avec le produit de l'iodation de l'hexapeptide (3-8) de l'AngII, maintenant appelé angiotensine IV (AngIV). La *figure 2* montre que la liaison de ^{125}I-AngIV aux membranes de cellules endothéliales d'aorte de bœuf est inhibée de façon dépendante de la dose par des concentrations croissantes d'AngIV non radioactives. Ces expériences de saturation ont révélé une densité de sites de liaison de l'ordre de 0,5 pmole/mg de protéines et une forte affinité avec une constante de liaison de l'ordre de 1 nM [10]. L'AngII est aussi capable d'inhiber la liaison de ^{125}I-AngIV mais des concentrations beaucoup plus élevées sont nécessaires pour obtenir un effet équivalent. Les analogues non peptidiques L-158,809 et PD 123319 sont incapables d'inhiber la liaison de ^{125}I-AngIV, même à des concentrations aussi élevées que 10µM. Ces résultats démontrent clairement que le site de liaison de l'AngIV (maintenant appelé récepteur AT_4) est une entité distincte des récepteurs classiques AT_1 et AT_2 de l'AngII. Ces résultats démontrent aussi que le ligand privilégié du récepteur AT_4 n'est pas l'AngII mais plutôt un fragment de l'AngII.

L'AngIV est retrouvée dans la circulation sanguine [11-12]. Comme il est suggéré sur la *figure 1*, l'AngIV peut provenir de l'hydrolyse de l'AngIII par les aminopeptidases B ou M qui sont localisées à la surface des cellules endothéliales ou des cellules musculaires lisses [13]. L'AngIV peut aussi provenir de l'hydrolyse de l'AngII par l'enzyme dipeptidyl aminopeptidase III qui retranche le dipeptide Asp-Arg [14]. Les premiers éléments en faveur de l'existence du récepteur AT_4 ont été obtenus avec des membranes de cortex surrénalien bovin [15, 16]. Ces études ont démontré très clairement que le récepteur AT_4 est différent des récepteurs AT_1 et AT_2. Les études suivantes ont montré que le récepteur AT_4 est présent dans un grand nombre de tissus incluant le cœur, les surrénales, le muscle lisse vasculaire, l'endothélium, le rein, le côlon, la prostate et le cerveau de plusieurs espèces animales dont l'homme, le singe, le bœuf, le cobaye, le lapin et le rat (pour revue, *voir* [17]). Les études des relations entre structure et activité menées avec divers analogues peptidiques ont permis d'établir les principaux critères de sélectivité du récepteur AT_4. L'affinité du ligand diminue considérablement si la Val aminoterminale est clivée ou encore si l'extrémité aminoterminale est allongée par des acides aminés additionnels. Les positions 4, 5 et 6 carboxyterminales sont assez flexibles et peuvent accommoder des substitutions variées d'acides aminés. La délétion séquentielle des acides aminés carboxyterminaux entraîne une perte graduelle mais incomplète d'affinité ; celle-ci, quoique très faible, est toujours présente dans le cas du tripeptide Val-Tyr-Ile. La pré-

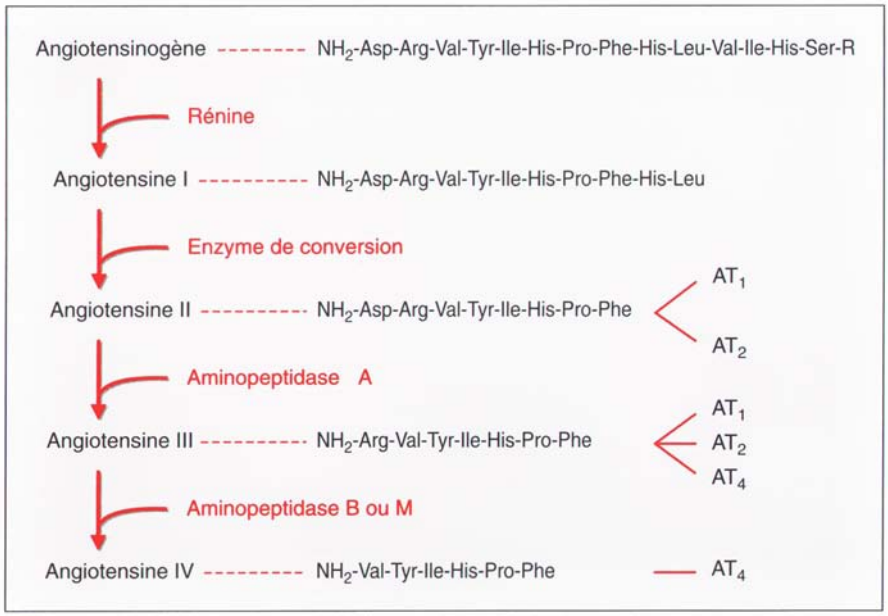

Figure 2. ***Liaison de ^{125}I-AngIV aux cellules endothéliales d'aorte de bœuf.*** *En ordonnée: pourcentage de liaison spécifique de ^{125}I-AngIV. En abscisse: concentration des divers ligands non radioactifs. Les résultats montrent que le site de liaison de ^{125}I-AngIV possède une forte affinité pour l'AngIV, une faible affinité pour l'AngII et ne reconnaît pas les ligands sélectifs des récepteurs AT1 (L-158,809) ou AT2 (PD 123319).*

sence d'une fonction amine primaire en position 1 est essentielle pour l'affinité. Le clivage, la méthylation ou la cyclisation de cette amine cause une perte importante d'affinité. L'acide aminé aminoterminal doit être de la configuration L. Les études préliminaires semblent aussi indiquer qu'un acide aminé aromatique est nécessaire en position 2, afin de maintenir une interaction de forte affinité avec le récepteur AT_4 [10, 17]. De nombreuses autres études devront être effectuées afin de développer des analogues plus résistants au métabolisme, de plus forte affinité pour le récepteur ou possédant des propriétés antagonistes. Ces nouveaux composés seront utiles pour la caractérisation du récepteur AT_4 et pour la définition de son rôle physiologique.

La structure moléculaire du récepteur AT_4, son mécanisme de transduction et les seconds messagers intracellulaires engendrés lors de son activation sont actuellement inconnus. Nos études préliminaires révèlent que les concentrations intracellulaires de Ca^{2+}, d'inositolphosphates, d'AMPc et d'acide arachidonique ne sont pas modifiées lors de la stimulation des cellules endothéliales par de fortes concentrations d'AngIV. La liaison de ^{125}I-AngIV aux membranes de cellules endothéliales n'est pas influencée par le GTPγS. Bien que le gène codant pour le récepteur AT_4 n'ait été ni cloné ni séquencé, tous ces résultats suggèrent que le récepteur n'appartient pas à la famille des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G. Des études de réticulation avec le disuccinimidyl subérate ont permis d'identifier la masse moléculaire du récepteur AT_4 *(figure 3)*. La bande majoritaire migrant sur un gel de 7,5 % de polyacrylamide révèle une masse moléculaire apparente de 186 kDa. Quelques bandes mineures de masses moléculaires plus grandes sont aussi réticulées de façon spécifique. Ces bandes pourraient représenter des types différents de récepteurs AT_4 mais il est plus attrayant de suggérer que ces bandes représentent divers complexes multimériques, homogènes ou hétérogènes, composés du ligand AngIV, de son récepteur AT_4 et de différentes protéines possiblement impliquées dans le mécanisme de transduction du récepteur. Des résultats très semblables ont été obtenus en utilisant une approche de marquage par photoaffinité [17]. Cette approche a permis d'identifier une bande majoritaire de 160 kDa et quelques bandes minoritaires de masses moléculaires plus élevées. Les auteurs ont suggéré la possibilité que le récepteur AT_4 appartienne à la famille des récepteurs des facteurs de croissance ou des cytokines. Cette hypothèse est compatible avec des résultats mon-

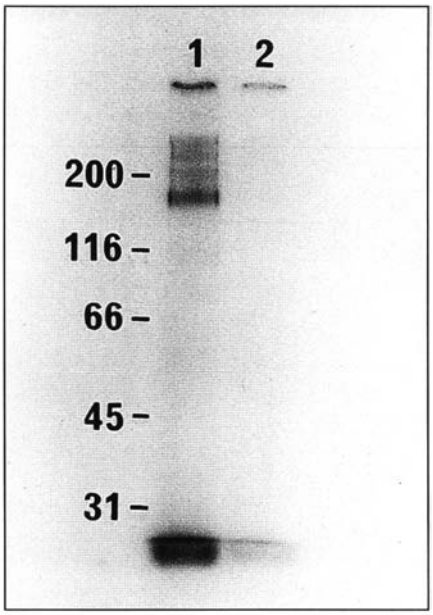

Figure 3. ***Réticulation du récepteur AT_4 des cellules endothéliales de bœuf.*** *Piste 1 : autoradiogramme montrant la migration sur un gel de polyacrylamide du récepteur AT_4 marqué avec l'^{125}I-AngIV par réticulation avec le disuccinimidyl subérate. Piste 2 : la réticulation a été effectuée en présence d'une concentration saturante d'AngIV non radioactive. Les chiffres à gauche indiquent la migration des standards de tailles moléculaires connues. L'autoradiogramme révèle une bande majoritaire ayant une taille moléculaire apparente de 186 kDa et quelques bandes minoritaires ayant des tailles moléculaires supérieures.*

trant l'incorporation accrue de ^{3}H-thymidine dans des cellules endothéliales de veines coronaires stimulées à l'AngIV en présence de bFGF [17]. La démonstration directe de l'activité tyrosine kinase ou de l'association à une tyrosine kinase de type Jak ou Tyk [18] appuierait cette hypothèse.

Aucun rôle physiologique n'a encore été attribué à l'AngIV. Dans des tests neuro-comportementaux chez le rat, l'AngIV augmente l'activité psychotrope [2] et s'avère aussi puissante que l'AngII pour améliorer les processus reliés à l'apprentissage et à la mémoire [19]. L'administration topique d'AngIV dans le cerveau de lapin augmente la vasodilatation des artérioles cérébrales induite par la L-arginine [20]. Un effet similaire a aussi été observé chez le rat chez lequel l'injection systémique d'AngIV augmente de façon importante et soutenue le débit sanguin rénal [16]. Dans cette même étude, l'AngII a produit un résultat tout à fait opposé. Les effets hémodynamiques de l'AngIV semblent toutefois difficiles à reproduire et certains auteurs suggèrent qu'ils pourraient découler d'une interaction de faible affinité avec les récepteurs AT_1 [21]. Si comme suggéré auparavant, le récepteur AT_4 appartient à la famille des récepteurs des cytokines, il est fort probable que les effets immédiats observés lors de l'injection systémique d'AngIV puissent varier considérablement d'une étude à l'autre, compte tenu de l'état particulier des animaux (âge, sexe, régime alimentaire, etc.). Le mécanisme d'action cellulaire des cytokines et des facteurs de croissance implique une activité transcriptionnelle dans le noyau suivie d'une synthèse protéique. Bien que lors des étapes initiales de ce mécanisme (phosphorylation de substrats) il est concevable que certaines activités cellulaires soient modulées de façon immédiate, on s'attend plutôt à ce que les principaux effets des cytokines et facteurs de croissance soient observées à plus long terme.

Plusieurs questions restent posées quant au rôle et à l'importance physiologique de l'AngIV. Les données accumulées suggèrent toutefois l'existence d'un nouveau système complémentaire du système rénine/angiotensine incluant une activité enzymatique qui produit une nouvelle hormone interagissant avec un site de liaison spécifique distribué dans de nombreux tissus à travers plusieurs espèces animales. Les efforts pour caractériser le récepteur AT_4 et son mécanisme d'action devraient fournir des résultats qui permettront d'orienter les recherches visant à définir l'importance physiologique de ce nouveau système ■

Remerciements

Ce travail a été financé par des fonds provenant du Conseil de recherches médicales du Canada et de la Fondation québécoise des maladies du cœur.

International Association for the Study of Lung Cancer Atelier

BASES BIOLOGIQUES DE LA PRÉVENTION DU CANCER BRONCHIQUE

Nancy, France, 20-22 octobre 1996

Orateurs :
J. Battey, Rockville
C. Bonaiti-Pellié, Paris
N.E.C. Bradley, Montréal
V. Castronovo, Liège
F. Cuttitta, Bethesda
J. Field, Liverpool
H. Fujiki, Saitama
A. Gazdar, Dallas
R. Gemmill, Denver
S. Hanash, Ann Arbor
C. Harris, Bethesda
F. Hirsch, Copenhagen
M. Hogan, Houston
W.K. Hong, Houston
D.R. Jacobson, New York
G.L. Johnson, Denver
S. Lam, Vancouver
A. Martinez, Bethesda
J.-F. Mornex, Lyon
J. Mulshine, Bethesda
U. Pastorino, London
A. Pavirani, Strasbourg
P. Rabbitts, Cambridge
E. Rozengurt, London
A. Sasco, Lyon
I. Schauer, Denver
J. Seidegard, Lund
T. Soussi, Paris
G. Sozzi, Milano
M. Tockman, Baltimore
J.M. Vignaud, Nancy

Cet atelier est ouvert à tous
Le nombre de participants sera limité
Date limite de dépôt des résumés :
15 septembre 1996
Pour toute information, écrire ou téléphoner :
Yves Martinet,
Service de Pneumologie, Hôpital de Brabois,
54511 Vandœuvre-lès-Nancy, France
Tél. : (33) 83.15.35.80
Fax : (33) 83.15.35.41

RÉFÉRENCES

1. Ferrario CM, Brosnihan KB, Diz DI, Jaiswal N, Khosla MC, Milsted A, Tallant A. Angiotensin-(1-7) : a new hormone of the angiotensin system. *Hypertension* 1991 ; 18 : 126-33.

2. Braszko JJ, Kupryszewski B, Witczuk B, Wisniewski K. Angiotensin II (3-8) hexapeptide affects motor activity performance of passive avoidance and a conditioned avoidance response in rats. *Neuroscience* 1988 ; 27 : 777-83.

3. Chiu AT, Herblin WF, McCall DE, Ardecky RJ, Carini DJ, Duncia JV, Pease LJ, Wong PC, Wexler RR, Johnson AL, Timmermans PBMWM. Identification of angiotensin II receptor subtypes. *Biochem Biophys Res Commun* 1989 ; 182 : 388-94.

4. Chang RSL, Lotti VJ. Two distinct angiotensin II receptor binding sites in rat adrenal revealed by new selective nonpeptide ligands. *Mol Pharmacol* 1990 ; 37 : 347-51.

5. Whitebread S, Mele M, Kamber B, de Gasparo M. Preliminary biochemical characterization of two angiotensin II-receptor subtypes. *Biochem Biophys Res Commun* 1989 ; 163 : 284-91.

6. Tsuda T, Kawahara Y, Ishida Y, Koide M, Shii K, Yokoyama M. Angiotensin II stimulates two myelin basic protein/microtubule-associated protein 2 kinases in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 1992 ; 71 : 620-30.

7. Marrero MB, Schieffer B, Paxton WG, Heerdt L, Berk BC, Delafontaine P, Bernstein KE. Direct stimulation of JAK/STAT pathway by the angiotensin II AT_1 receptor. *Nature* 1995 ; 375 : 247-50.

8. Giasson E, Meloche S. Role of p70 S6 protein kinase in angiotensin II-induced protein synthesis in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1995 ; 270 : 5225-31.

9. Bernier SG, Fournier A, Guillemette G. A specific binding site recognizing a fragment of angiotensin II in bovine adrenal cortex membranes. *Eur J Pharmacol* 1994 ; 271 : 55-63

10. Bernier SG, Servant G, Boudreau M, Fournier A, Guillemette G. Characterization of a binding site for angiotensin IV on bovine aortic endothelial cells. *Eur J Pharmacol Mol Pharmacol* 1995 ; 291 : 191-200.

Sylvie G. Bernier
Gaétan Guillemette

Département de Pharmacologie, Faculté de médecine, Université de Sherbrooke, 3001, 12e avenue Nord, Sherbrooke, Canada.

RÉFÉRENCES

11. Cain MD, Catt KJ, Coghlan JP. Immunoreactive fragments of angiotensin II in blood. *Nature* 1969 ; 223 : 617-8.

12. Chappell MC, Brosnihan KB, Diz DI, Ferrario CM. Identification of angiotensin (1- 7) in rat brain. Evidence for differential processing of angiotensin peptides. *J Biol Chem* 1989 ; 264 : 16518-23.

13. Ahmad S, Ward PE. Role of aminopeptidase activity in the regulation of the pressor activity of circulating angiotensins. *J Pharmacol Exp Ther* 1990 ; 252 : 643-50.

14. Lee CM, Snyder SH. Dipeptidyl-aminopeptidase III of rat brain. Selective affinity for enkephalin and angiotensin. *J Biol Chem* 1982 ; 257 : 12043-50.

15. Jarvis MF, Gessner GW, Ly CG. The angiotensin hexapeptide 3-8 fragment potently inhibits ~2sI-Angiotensin II binding to non-AT_1 or AT_2 recognition sites in bovine adrenal cortex. *Eur J Pharmacol* 1992 ; 219 : 319-22.

16. Swanson GN, Hanesworth JM, Sardinia MF, Coleman JK, Wright JW, Hall KL, Miller Wing AV, Stobb JW, Cook VI, Harding EC, Harding JW. Discovery of a distinct binding site for angiotensin II (3-8), a putative angiotensin four receptor. *Regul Pept* 1992 ; 40 : 409-19.

17. Wright JW, Krebs LT, Stobb JW, Harding JW. The angiotensin IV system : Functional implications. *Front Neuroendocrin* 1995 ; 16 : 23-52.

18. Kahn A. De la membrane au noyau, un couplage direct entre des récepteurs de cytokines et la machinerie transcriptionnelle. *médecine/sciences* 1994 ; 10 : 202-5.

19. Wright JW, Miller-Wing AV, Shaffer MJ, Higginson C, Wright DE, Hanesworth JM, Harding JW. AngIV hippocampal binding : Potential role in the facilitation of memory. *Brain Res Bull* 1993 ; 32 : 497-502.

20. Haberl RL, Decker PJ, Einhaupl KM. Angiotensin degradation products mediate endothelium-dependent dilation of rabbit brain arterioles. *Circ Res* 1991 ; 68 : 1621-7.

21. Gardiner SM, Kemp PA, March JE, Bennett T. Regional haemodynamic effects of angiotensin (3-8) in conscious rats. *Br J Pharmacol* 1993 ; 110 : 159-62.

TIRÉS À PART

S.G. Bernier.