

Récepteurs de l'angiotensine II : rôles dans le contrôle de la croissance cellulaire et mécanismes de transmission du signal

Catherine Chassagne
Marc J. Servant
Sylvain Meloche

L'angiotensine II est une hormone peptidique qui exerce une multitude d'actions biologiques au niveau du système cardio-vasculaire, du rein et du système nerveux central. Les effets de l'hormone sont relayés par deux sous-types de récepteurs, AT₁ et AT₂, appartenant à la famille des récepteurs à sept domaines transmembranaires. Outre ses effets classiques, l'angiotensine II stimule la croissance de divers types cellulaires, notamment les myocytes cardiaques et les cellules musculaires lisses vasculaires. Dans ces dernières, cet effet hypertrophique est relayé par le récepteur AT₁, puis par plusieurs seconds messagers et un réseau complexe d'au moins trois cascades de protéine kinases : la p70 S6 kinase, les MAP kinases ERK1/ERK2 et une tyrosine kinase. A l'inverse, des travaux récents suggèrent que la liaison de l'Ang II au récepteur de sous-type AT₂ pourrait exercer un effet inhibiteur sur la croissance de certaines cellules. Les mécanismes par lesquels le signal du récepteur AT₂ est transmis restent cependant inconnus.

ADRESSE

C. Chassagne: *stagiaire postdoctorale*. M.J. Servant: *étudiant en doctorat*. S. Meloche: *chercheur agrégé*. Centre de recherche, Hôtel-Dieu de Montréal et département de pharmacologie, université de Montréal, 3850, rue Saint-Urbain, Montréal, Québec, H2W 1T8 Canada.

L'angiotensine II (Ang II), principal médiateur du système rénine-angiotensine (SRA), exerce une action vasoconstrictrice sur l'ensemble du réseau artériel, tant périphérique que coronaire, contrôlant ainsi la pression artérielle. Elle contribue également à la régulation de certaines fonctions cellulaires

périphériques, comme la réabsorption rénale de sodium, la contraction des myocytes cardiaques et des cellules musculaires lisses (CML), la libération d'aldostérone par la cortico-surrénale, de peptides vasoactifs par l'endothélium vasculaire, et de catécholamines au niveau du système nerveux autonome sympathique [1]. Dans le système nerveux central, elle

RÉFÉRENCES

- Brooks DP, Ruffolo RR Jr. Functions mediated by peripheral angiotensin II receptors. In : Ruffolo RR Jr. ed. *Angiotensin II Receptors. Volume 1: Molecular Biology, Biochemistry, Pharmacology, and Clinical Perspectives*. Boca Raton : CRC Press Inc, 1994 : 71-102.
- Schelling P, Fischer H, Ganten D. Angiotensin and cell growth : a link to cardiovascular hypertrophy? *J Hypertens* 1991 ; 9 : 3-15.
- Pratt RE, Dzau VJ. Molecular and cellular biology of the angiotensin-mediated growth of the cardiovascular system. In : Raizada MK, Phillips MI, Summers C, eds. *Cellular and Molecular Biology of the Renin-Angiotensin System*. Boca Raton : CRC Press Inc., 1993 : 471-83.
- Timmermans PBMWM, Wong PC, Chiu AT, et al. Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists. *Pharmacol Rev* 1993 ; 45 : 205-51.
- Inagami T, Mizukoshi M, Guo DF. Angiotensin II receptor : molecular cloning, functions, and regulation. In : Saavedra JM, Timmermans PBMWM, eds. *Angiotensin receptors*. New York : Plenum Press, 1994 : 1-15.
- De Gasparo M, Levens NR, Kamber B, et al. The angiotensin II AT₂ receptor subtype. In : Saavedra JM, Timmermans PBMWM, eds. *Angiotensin Receptors*. New York : Plenum Press, 1994 : 95-117.
- Nahmias C, Strosberg AD. The angiotensin AT₂ receptor : searching for signal-transduction pathways and physiological function. *Trends Pharmacol Sci* 1995 ; 16 : 223-5.
- Curnow KM, Pascoe L, White PC. Genetic analysis of the human type-1 angiotensin II receptor. *Mol Endocrinol* 1992 ; 6 : 1113-8.
- Yamano Y, Ohyama K, Chaki S, Guo DF, Inagami T. Identification of amino acid residues of rat angiotensin II receptor for ligand binding by site directed mutagenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 1992 ; 187 : 1426-31.
- Chassagne C, Beatty BG, Meloche S. Assignment of the human angiotensin-II type 2 receptor gene (*AGTR2*) to chromosome Xq22-q23 by fluorescence *in situ* hybridization. *Genomics* 1995 ; 25 : 601-3.
- Ohyama K, Yamano Y, Chaki S, Kondo T, Inagami T. Domains for G-protein coupling in angiotensin II receptor Type 1 : studies by site-directed mutagenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 1992 ; 189 : 677-83.
- Bihoreau C, Monnot C, Davies E, et al. Mutation of Asp⁷⁴ of the rat angiotensin II receptor confers changes in antagonist affinities and abolishes G-protein coupling. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993 ; 90 : 5133-7.
- Metsärinne KP, Stoll M, Falkenhahn M, Gohlke P, Unger T. Inhibiting the effects of angiotensin on cardiovascular hypertrophy. In : Saavedra JM, Timmermans PBMWM, eds. *Angiotensin receptors*. New York : Plenum Press, 1994 : 235-53.

provoque la libération de vasopressine et de catécholamines, et a des effets sur la soif et sur le comportement. Outre ces effets classiques, l'Ang II stimule la croissance de plusieurs types de cellules, dont les CML vasculaires (CMLV), les cellules corticosurrénales, les fibroblastes et les myocytes cardiaques, les cellules mésoangiales et les cellules endothéliales de la microvascularisation coronaire [2, 3]. Dans cette revue, nous ferons le point sur le rôle des sous-types du récepteur de l'Ang II dans le contrôle de la croissance cellulaire et sur les mécanismes associés à cette réponse.

Les récepteurs de l'Ang II : caractérisation, distribution tissulaire et structure

Les effets de l'Ang II sur les systèmes cardio-vasculaire, endocrine et nerveux dépendent de sa liaison à des récepteurs membranaires spécifiques. Les deux sous-types majeurs

du récepteur de l'Ang II, AT₁ et AT₂, ont été identifiés notamment grâce à l'utilisation d'antagonistes non peptidiques sélectifs : le losartan (DuP 753), un dérivé biphényltétrazole, pour le sous-type AT₁ et le PD123319, de la famille des tétrahydro-imidazopyridines, pour le sous-type AT₂ [4, 5]. D'autres critères de classification, comprenant principalement la sensibilité aux agents réducteurs et le couplage à divers seconds messagers, sont résumés dans le *Tableau I*. Ces critères ont permis de dresser une carte de la distribution des récepteurs AT₁ et AT₂. Ainsi, chez diverses espèces adultes (homme, singe, bœuf, lapin, rat), le récepteur AT₁ est majoritaire dans un grand nombre de tissus ou d'organes incluant l'aorte, les artères pulmonaires et rénales, d'une façon plus générale les muscles lisses vasculaires, le cœur, les poumons, les cortex rénal et surrénal, le cerveau et le foie. C'est le récepteur AT₁ qui relaie la majorité des effets physiologiques de l'Ang II, incluant ceux sur la croissance cellu-

Tableau I

PROPRIÉTÉS PHARMACOLOGIQUES ET BIOCHIMIQUES DES SOUS-TYPES DE RÉCEPTEURS DE L'ANGIOTENSINE II

	AT ₁	AT ₂
Ordre de puissance	Saralazine > All I > All II	All II ≥ All I ≥ Saralazine
Antagonistes sélectifs	Losartan (DuP 753) ; EXP3174 ; DuP 532 ; L-158809 ; SK&F 108566 ; GR117289 ; TCV-166	PD123177 ; PD123319 ; PD121981 ; PD124125
Effets des agents réducteurs	Inactivation	Augmentation
Couplage aux protéines G	Oui	Oui/Non
Voies de signalisation	↓Adénylyl cyclase ↑PLC ↑PLA ₂ ↑PLD ↑Phosphorylation de tyrosine	↓GMPc ↑PLA ₂ ↑↓Tyrosine phosphatase
Structure	359 acides aminés 7 domaines transmembranaires	363 acides aminés, 7 domaines transmembranaires
Masse moléculaire	≈ 60 kDa	≈ 70 kDa

All = angiotensine II ; All II = angiotensine III.

laire [1, 4]. A l'opposé, chez l'adulte, la synthèse du récepteur AT₂ est restreinte : elle se retrouve essentiellement dans la médullosurrénale, l'appareil reproducteur féminin (myomètre utérin, trompes de Fallope et ovaires) et des régions définies du cerveau. Cette localisation spécifique, associée au fait que certaines réponses à l'Ang II, telles les sécrétions de prolactine et d'hormone lutéinisante, la dilatation des artérioles cérébrales ou la soif chez le rat sont inhibées *in vivo* par des antagonistes sélectifs du sous-type AT₂, suggère que le récepteur AT₂ pourrait jouer un rôle dans les fonctions cérébrales et de reproduction chez l'adulte [4, 6].

Le clonage moléculaire des ADN complémentaires codant pour les récepteurs AT₁ en 1991 [5] et AT₂ en 1993 [7] a révélé que ces récepteurs appartiennent à la grande famille des récepteurs à sept domaines transmembranaires (figure 1). Ces récepteurs sont généralement caractérisés par leur couplage aux protéines G hétérotrimériques. Suite au clonage du récepteur AT₁ bovin et de rat, une seconde isoforme, désignée AT_{1B}, a été isolée chez le rat et la souris [5]. Les deux isoformes du récepteur AT₁, AT_{1A} et AT_{1B}, sont très semblables, partageant 95 % d'analogie au niveau de la séquence protéique. Contrairement à celui des rongeurs, le génome humain contient un seul gène codant pour le récepteur AT₁, localisé sur le chromosome 3q21-3q25 [8]. Le récepteur AT₁ est constitué de 359 acides aminés avec une masse moléculaire déduite de 41 kDa. Cependant, la masse moléculaire observée est d'environ 65 kDa, résultat de la glycosylation de la protéine. En effet, trois sites consensus de N-glycosylation sont présents dans les boucles extracellulaires du récepteur (figure 1). Cette glycosylation n'apparaît cependant pas nécessaire à la liaison de l'Ang II, car la mutation des résidus asparagine en résidus acide aspartique n'a aucun effet sur l'affinité du récepteur [9]. Les quatre régions extracellulaires contiennent également des résidus cystéine dont la mutation en résidus glycine réduit considérablement l'affinité du récepteur AT₁ pour l'Ang II [9].

Le récepteur AT₂ est lui aussi codé par un gène unique chez l'homme,

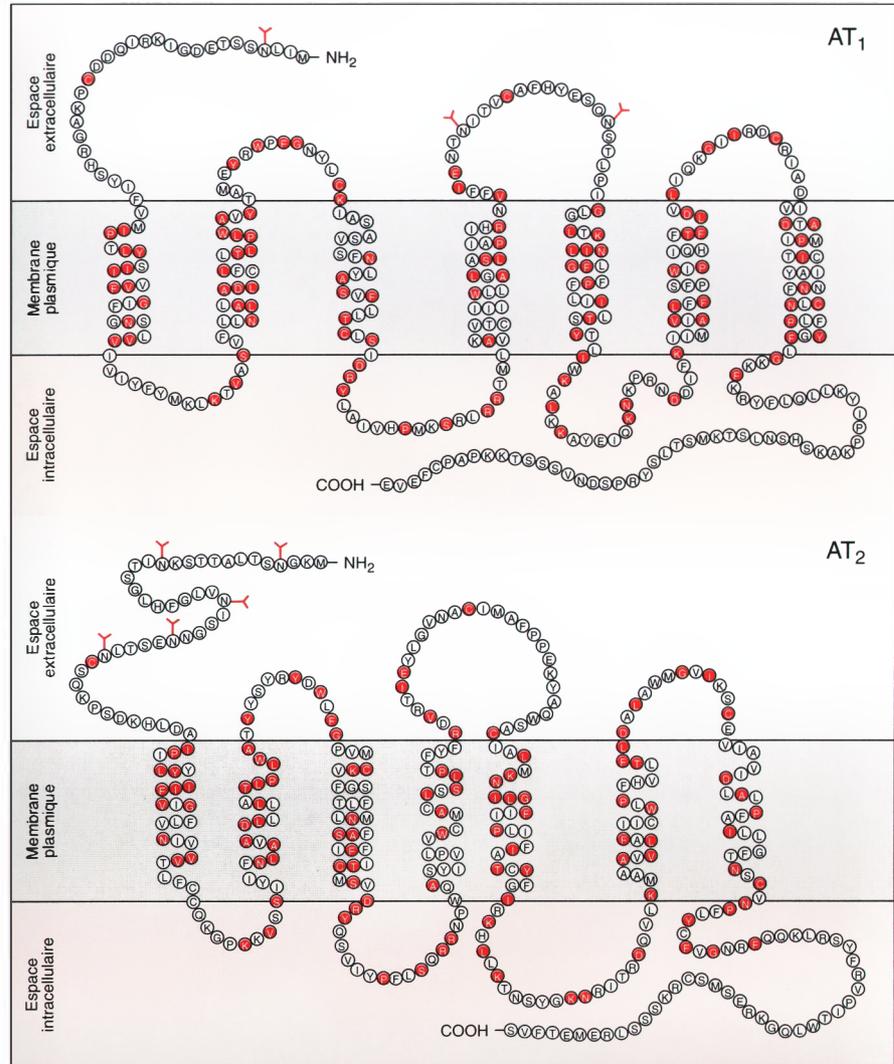


Figure 1. **Structure primaire et représentation schématique des récepteurs de l'Ang II.** Les séquences humaines des sous-types AT₁ et AT₂ des récepteurs de l'Ang II sont présentées. Les résidus identiques entre les deux protéines sont indiqués par des cercles rouges. Les sites de N-glycosylation sont représentés par le signe Y (en rouge).

dont le produit est une protéine de 363 acides aminés avec une masse moléculaire déduite de 41,3 kDa. La variabilité du poids moléculaire du récepteur selon les tissus ou les cellules serait, comme pour le récepteur AT₁, liée à divers degrés de glycosylation. Par la technique d'hybridation *in situ*, nous avons localisé le gène AT₂ humain sur le chromosome X dans la région q22-q23 [10]. La séquence du récepteur AT₂ est faiblement analogue à celle du récepteur AT₁, avec 30 % à 35 % de résidus identiques. Toutefois, les récepteurs AT₁ et AT₂ contiennent des séquences très conservées qui sont susceptibles

d'être impliquées dans la liaison du ligand. Parmi celles-ci, deux groupes de six acides aminés retrouvés dans les domaines transmembranaires tm2 (Thr-Leu-Pro-Leu-Trp-Ala), et tm5 (Lys-Asn-Ile-Leu-Gly-Phe) dans lequel on a montré que le résidu Lys était crucial à la liaison de l'Ang II au récepteur AT₁ [9]. D'autres résidus, tels le motif Asp-Arg-Tyr au début de la seconde boucle intracellulaire et le résidu Asp 74 dans le domaine tm2, essentiels au couplage du récepteur AT₁ aux protéines G et à la phospholipase C [11, 12], sont aussi retrouvés dans le récepteur AT₂. Pourtant, en dépit de ces conservations, le mode

RÉFÉRENCES

14. Lambert C, Massillon Y, Meloche S. Upregulation of cardiac angiotensin II AT₁ receptors in congenital cardiomyopathic hamsters. *Circ Res* 1995; 77: 11001-7.
15. Geisterfer AAT, Peach MJ, Owens GK. Angiotensin II induces hypertrophy, not hyperplasia, of cultured rat aortic smooth muscle cells. *Circ Res* 1988; 62: 749-56.
16. 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.
17. Paquet JL, Baudoin-Legros M, Brunelle G, Meyer P. Angiotensin II-induced proliferation of aortic myocytes in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 1990; 8: 565-72.
18. Meloche S, Servant MJ, Leduc I, Pellerin J. Angiotensin II stimulates protein synthesis but not DNA synthesis in rat fibroblasts expressing the human AT₁ receptor. *Biochem J* 1996 (sous presse).
19. Turla MB, Thompson MM, Corjay MH, Owens GK. Mechanisms of angiotensin II- and arginine vasopressin-induced increases in protein synthesis and content in cultured rat aortic smooth muscle cells. *Circ Res* 1991; 68: 288-99.
20. Rao GN, Griending KK, Frederickson RM, Sonenberg N, Alexander RW. Angiotensin II induces phosphorylation of eukaryotic protein synthesis initiation factor 4E in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1994; 269: 7180-4.
21. Pause A, Belsham GJ, Gingras AC, et al. Insulin-dependent stimulation of protein synthesis by phosphorylation of a regulator of 5'-cap function. *Nature* 1994; 371: 762-7.
22. Fleurent M, Gingras AC, Sonenberg N, Meloche S. Angiotensin II stimulates phosphorylation of the translational repressor 4E-binding protein 1 by a MAP kinase-independent mechanism *J Biol Chem* 1996 (sous presse).
23. Catt KJ, Sandberg K, Balla T. Angiotensin II receptors and signal transduction mechanisms. In: Raizada MK, Phillips MI, Summers C, eds. *Cellular and Molecular Biology of the Renin-Angiotensin System*. Boca Raton: CRC Press Inc., 1993: 307-56.
24. Marrero MB, Paxton WG, Duff JL, Berk BC, Bernstein KE. Angiotensin II stimulates tyrosine phosphorylation of phospholipase C- γ 1 in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1994; 269: 10935-9.
25. Rainey WE, Byrd EW, Sinnokrot RA, Carr BR. Angiotensin-II activation of cAMP and corticosterone production in bovine adrenocortical cells: effects of nonpeptide angiotensin-II antagonists. *Mol Cell Endocrinol* 1991; 81: 33-41.
26. Lassègue B, Alexander RW, Clark M. Phosphatidylcholine is a major source of phosphatidic acid and diacylglycerol in angiotensin II-stimulated vascular smooth muscle cells. *Biochem J* 1993; 292: 509-17.

de transmission du signal du récepteur AT₂ semble atypique, différent de la majorité des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G (*m/s* n° 10, vol. 10, p. 1052).

Récepteur AT₁ et hypertrophie cellulaire

De nombreuses études démontrent que l'activation du récepteur AT₁ par l'Ang II exerce un effet trophique à long terme sur plusieurs tissus ou types cellulaires, notamment sur le cœur et le muscle lisse vasculaire. Parmi les principaux résultats obtenus *in vivo*, citons: 1) l'inhibition de l'hypertrophie vasculaire chez les rats génétiquement hypertendus (SHR) traités par des inhibiteurs de l'enzyme de conversion (IEC) ou un antagoniste du récepteur AT₁; 2) le ralentissement de la croissance rapide du cœur chez le porc nouveau-né ou l'inhibition de l'hypertrophie du myo-

cardé chez des rats avec surcharge volémique ou des rats SHR traités par des IEC ou un antagoniste AT₁; et 3) le développement d'une hypertrophie vasculaire et cardiaque chez les rats traités par l'Ang II [13]. En outre, la synthèse des récepteurs AT₁ cardiaques augmente au cours de l'hypertrophie cardiaque d'origine expérimentale ou génétique chez l'animal, suggérant un rôle du récepteur dans la genèse ou le maintien de la croissance exagérée de ce tissu [14]. *In vitro*, l'Ang II stimule la croissance de plusieurs types cellulaires, conduisant à une réponse hypertrophique (CMLV, myocytes cardiaques, cellules tubulaires proximales) ou hyperplasique (fibroblastes cardiaques) selon la cellule [2, 3]. Dans les CMLV isolées de rats normaux, l'Ang II stimule la synthèse de protéines et induit une hypertrophie cellulaire, sans modifier la synthèse d'ADN (*figure 2*) [15, 16]. En revanche, l'Ang II exerce un effet

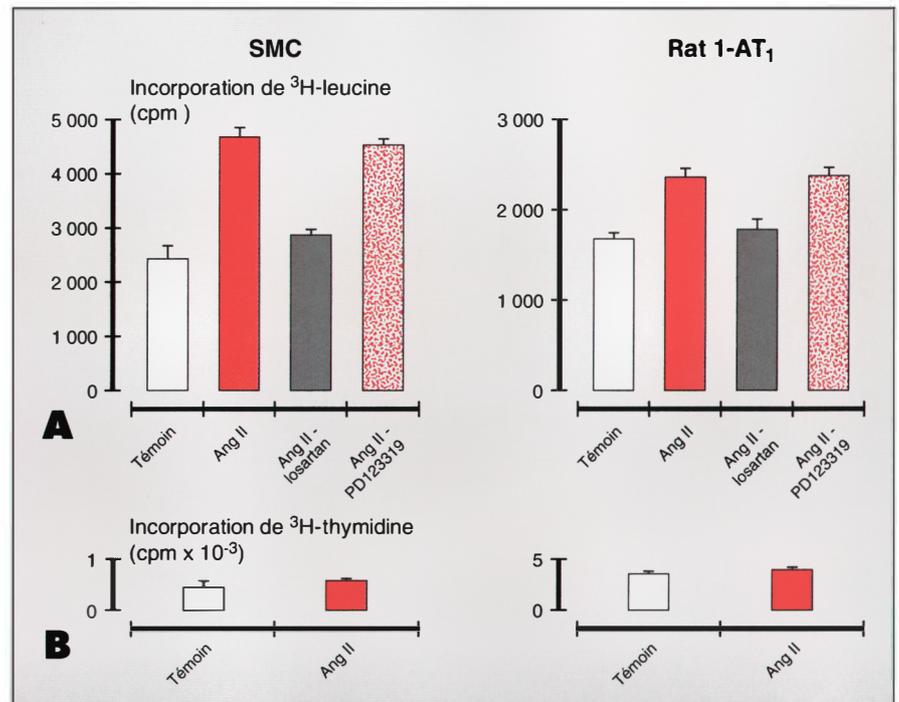


Figure 2. L'activation du récepteur AT₁ par l'Ang II stimule la synthèse de protéines mais pas celle d'ADN. Des cellules musculaires lisses aortiques (SMC) de rat ou des fibroblastes de rat transfectés avec le gène humain du récepteur AT₁ (Rat 1-AT₁), rendues quiescentes par incubation dans un milieu sans sérum, ont été stimulées pendant 24 heures avec de l'Ang II en absence ou en présence de losartan, l'antagoniste AT₁, ou de PD123319, l'antagoniste AT₂. (A) Vitesse de synthèse des protéines mesurée par incorporation de ³H-leucine. (B) Vitesse de synthèse d'ADN mesurée par incorporation de ³H-thymidine.

RÉFÉRENCES

27. Rao GN, Lassègue B, Alexander RW, Griendling KK. Angiotensin II stimulates phosphorylation of high-molecular-mass cytosolic phospholipase A2 in vascular smooth-muscle cells. *Biochem J* 1994; 299: 197-201.
28. Jefferies HBJ, Reihnard C, Kozma SC, Thomas G. Rapamycin selectively represses translation of the polypyrimidine tract mRNA family. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 4441-5.
29. Tsuda T, Kawahara Y, Shii K, Koide M, Ishida Y, Yokoyama M. Vasoconstrictor-induced protein-tyrosine phosphorylation in cultured vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett* 1991; 285: 44-8.
30. Servant MJ, Giasson E, Meloche S. Inhibition of growth factor-induced protein synthesis by a selective MEK inhibitor in aortic smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1996; 271: 16047-52.
31. Molloy CJ, Taylor DS, Weber H. Angiotensin II stimulation of rapid protein tyrosine phosphorylation and protein kinase activation in rat aortic smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1993; 268: 7338-45.
32. Leduc I, Haddad P, Giasson E, Meloche S. Involvement of a tyrosine kinase pathway in the growth-promoting effects of angiotensin II on aortic smooth muscle cells. *Mol Pharmacol* 1995; 48: 582-92.
33. Leduc I, Meloche S. Angiotensin II stimulates tyrosine phosphorylation of the focal adhesion-associated protein paxillin in aortic smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1995; 270: 4401-4.
34. Earp HS, Huckle WR, Dawson TL, Li X, Graves LM, Dy R. Angiotensin II activates at least two tyrosine kinases in rat liver epithelial cells. *J Biol Chem* 1995; 270: 28440-7.
35. Bhat GJ, Thekkumkara TJ, Thomas WG, Conrad KM, Baker KM. Angiotensin II stimulates *sis*-inducing factor-like DNA binding activity. *J Biol Chem* 1994; 269: 31443-9.
36. Marrero MB, Schieffer B, Paxton WG, et al. Direct stimulation of Jak/STAT pathway by the angiotensin II AT₁ receptor. *Nature* 1995; 375: 247-50.
37. Keiser JA, Panek RL. Pharmacology of AT₂ receptors. In: Saavedra JM, Timmermans PBMWM, eds. *Angiotensin receptors*. New York: Plenum Press, 1994: 135-49.
38. Viswanathan M, Saavedra JM. Expression of angiotensin II AT₂ receptors in the rat skin during experimental wound healing. *Peptides* 1992; 13: 783-6.
39. Lopez JJ, Lorell BH, Ingelfinger JR, et al. Distribution and function of cardiac angiotensin AT₁- and AT₂-receptor subtypes in hypertrophied rat hearts. *Am J Physiol* 1994; 267: H844-52.
40. Stoll M, Steckelings M, Paul M, Botari SP, Metzger R, Unger T. The angiotensin AT₂-receptor mediates inhibition of cell proliferation in coronary endothelial cells. *J Clin Invest* 1995; 95: 651-7.
- mitogène faible sur des CMLV isolées d'aortes de rats SHR [17]. Toutes ces réponses sont bloquées par le losartan et donc relayées par le récepteur AT₁. Fait intéressant, l'ajout d'Ang II à une lignée hétérologue de fibroblastes de rat synthétisant le récepteur AT₁ humain (Rat1-AT₁) stimule la synthèse de protéines mais pas la synthèse d'ADN (figure 2), en accord avec un rôle important du récepteur AT₁ dans l'hypertrophie cellulaire [18].
- Les bases moléculaires de l'action hypertrophique de l'Ang II restent à définir. Dans les CMLV, l'induction de la synthèse de protéines par l'Ang II est associée à une augmentation sélective du contenu cellulaire en protéines contractiles et en protéines de la matrice extracellulaire [19]. Cette augmentation de la production de protéines abondantes comme l' α -actine, la thrombospondine ou le collagène s'accompagne d'une augmentation concomitante de l'expression des ARN messagers, ce qui suggère que des changements au niveau transcriptionnel contribuent de façon importante à la stimulation globale de la synthèse de protéines par l'Ang II. En outre, des études récentes montrent que l'Ang II exerce des effets sur le niveau de phosphorylation des composantes de la machinerie traductionnelle de la cellule. Ainsi, dans les CMLV, le traitement par l'Ang II conduit à la phosphorylation du facteur d'initiation de la traduction eIF-4E, une sous-unité du facteur eIF-4F qui sert à lier la coiffe de l'ARN messager [20]. Outre sa régulation par phosphorylation, l'activité de eIF-4E est contrôlée par une famille de protéines, appelées *4E-binding proteins* (4E-BP), qui forment un complexe avec eIF-4E et inhibent le démarrage de la traduction (*m/s n°6, vol 11, p. 866*) [21]. Récemment, nous avons démontré que la liaison de l'Ang II au récepteur AT₁ stimule la phosphorylation de 4E-BP1 dans les CMLV, entraînant ainsi sa dissociation du facteur eIF-4E [22]. L'ensemble de ces observations indique que la stimulation globale de la synthèse de protéines, après activation du récepteur AT₁, pourrait résulter de changements tant au niveau transcriptionnel qu'au niveau traductionnel.

Voies de signalisation du récepteur AT₁

La liaison de l'Ang II au récepteur AT₁ active de nombreuses voies de signalisation par l'intermédiaire d'au moins deux classes de protéines G (figure 3). Le mécanisme le mieux documenté est l'activation de la phospholipase C, qui donne lieu à la formation de deux seconds messagers : l'inositol 1, 4, 5-trisphosphate (IP₃) et le diacylglycérol [4, 23]. L'IP₃ se lie à des récepteurs-canaux calciques spécifiques pour induire la libération de Ca²⁺ à partir de réservoirs intracellulaires, tandis que le diacylglycérol active plusieurs isoformes de la protéine kinase C. La stimulation de la phospholipase C (isoforme β) est insensible à la toxine de *Bordetella pertussis* et est probablement relayée par la sous-unité α d'une protéine G de la famille Gq [18, 23]. Cependant, une étude récente montre que l'Ang II stimule la phosphorylation de résidus tyrosine de la phospholipase C- γ 1 et suggère que cette dernière isoforme serait couplée au récepteur AT₁ [24]. Comme pour les autres hormones mobilisant le Ca²⁺, certains travaux suggèrent que l'Ang II stimule aussi l'influx de Ca²⁺ à travers des canaux calciques sensibles au potentiel et, possiblement, d'autres canaux activés par un récepteur [23]. Cependant, ces résultats demeurent controversés. Au niveau fonctionnel, de nombreux éléments plaident en faveur d'un rôle critique du Ca²⁺ et des isoformes de protéine kinase C dans l'action hypertrophique du récepteur AT₁. Par exemple, l'introduction d'une mutation ponctuelle dans le récepteur AT₁ qui découple le récepteur de la phospholipase C supprime totalement l'effet hypertrophique de l'Ang II (M. Servant, S. Meloche, résultats non publiés).

Dans plusieurs tissus cibles, l'Ang II inhibe l'activité de l'adénylyl cyclase par l'intermédiaire d'une protéine G_i sensible à la toxine de *Bordetella pertussis* [18, 23]. Cependant, la toxine n'interfère pas avec l'effet stimulant de l'Ang II sur la synthèse de protéines dans les CMLV et les cellules Rat1-AT₁, démontrant ainsi que les voies de signalisation dépendantes de G_i ne sont pas impliquées dans cette réponse [18]. Par ailleurs, il a aussi

été rapporté que la production d'AMP cyclique pouvait être augmentée dans certains tissus après activation du récepteur AT₁ [25]. L'Ang II active également la phospholipase D, qui hydrolyse la phosphatidylcholine en acide phosphatidique et choline

[26]. L'acide phosphatidique est métabolisé de nouveau en diacylglycérol par une phosphohydrolase, prolongeant ainsi l'accumulation du second messager. Enfin, l'Ang II stimule la phospholipase A₂ et donc la production d'acide arachidonique

dans certains tissus [27]. Le rôle exact des phospholipases D et A₂ dans l'effet hypertrophique de l'Ang II reste à préciser. La conséquence immédiate de ces signaux précoces est l'activation d'un réseau complexe de protéine kinases

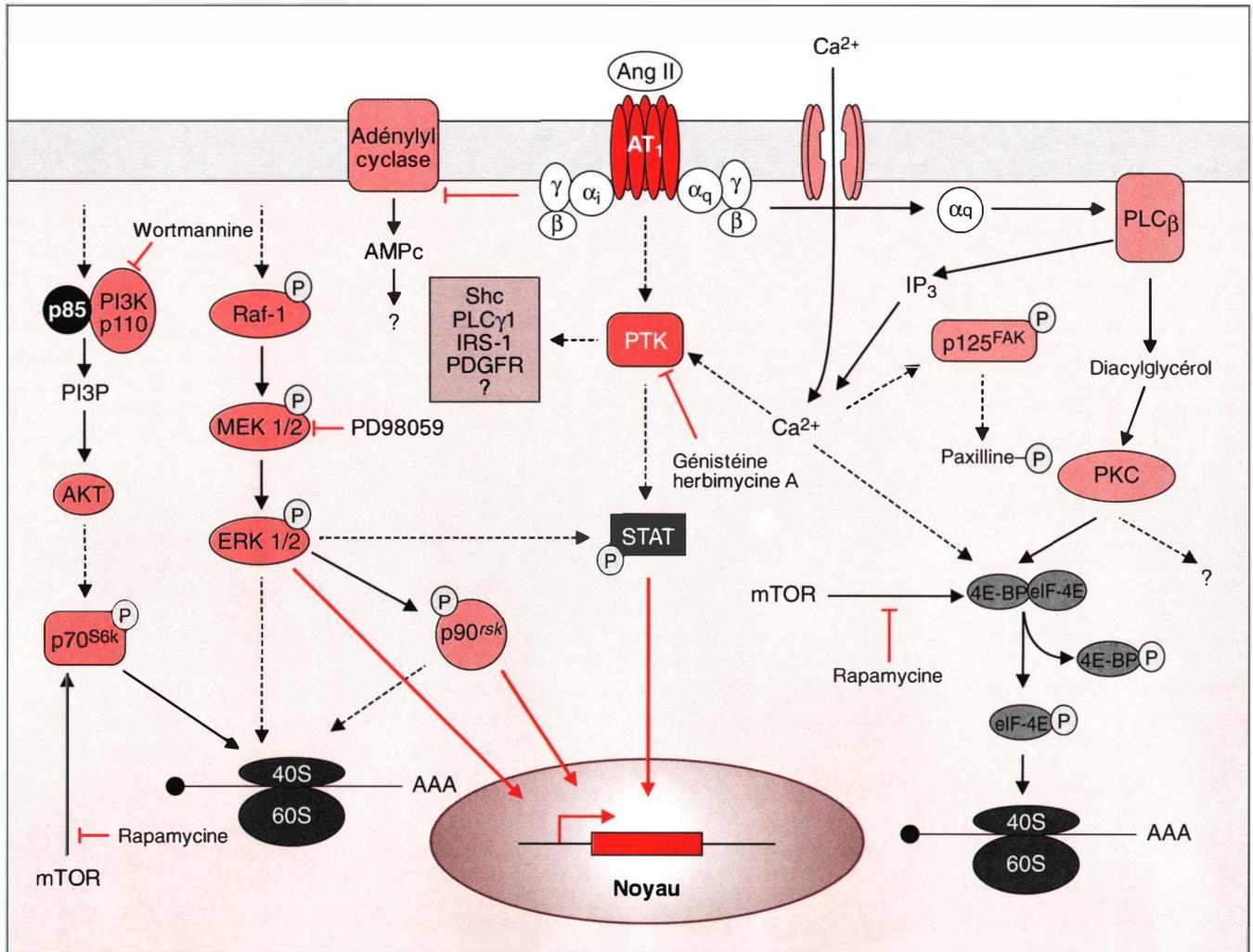


Figure 3. **Mécanismes de transmission du signal impliqués dans le contrôle de la synthèse de protéines par le récepteur AT₁.** La liaison de l'Ang II au récepteur AT₁ active plusieurs effecteurs cellulaires par l'intermédiaire d'au moins deux classes de protéines G, soit G_q et G_i. De nombreux éléments suggèrent que l'activation de la PLC par G_q et la production qu'elle entraîne d'IP₃ et de diacylglycérol, joue un rôle critique dans l'action trophique de l'Ang II. En revanche, les voies de transmission du signal dépendantes de G_i ne semblent pas impliquées dans cette réponse. L'augmentation de la concentration intracellulaire des seconds messagers conduit à l'activation de plusieurs cascades de protéine kinases qui agissent de façon synergique pour augmenter la vitesse de synthèse globale des protéines. L'effet hypertrophique de l'Ang II se manifeste par des changements au niveau de la transcription des gènes et de la vitesse de traduction des ARN messagers. Les flèches en pointillé indiquent que le nombre et la nature des intermédiaires est inconnu. Les protéine kinases sont représentées en rose. Abréviations: Ang II, angiotensine II ; PLC, phospholipase C ; PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase ; AKT, produit du proto-oncogène c-akt/protéine kinase B ; p70^{S6k}, p70 S6 kinase ; mTOR, target of rapamycin de mammifères ; MEK, MAP kinase/ERK Kinase ; ERK, Extracellular signal-Regulated Kinase ; PTK, protéine tyrosine kinase ; IRS-1 insulín receptor substrate 1 ; PDGFR, récepteur du PDGF (platelet-derived growth factor) ; STAT, signal transducer and activator of transcription ; FAK, focal adhesion kinase ; IP₃, inositol 1, 4, 5-trisphosphate ; PI3P: phosphatidyl-inositol 3-phosphate ; PKC, protéine kinase C ; eIF, facteur d'initiation de la traduction chez les eucaryotes ; 4E-BP, 4E-binding protein. La wortmannine inhibe la PI3K ; la rapamycine inhibe la p70^{S6k} et mTOR. Les génistéine et herbimycine sont des inhibiteurs des tyrosine kinases.

qui vont intégrer et propager les signaux vers les compartiments cellulaires impliqués dans le contrôle de la synthèse de protéines. Nous avons montré que l'activation du récepteur AT₁ stimule la phosphorylation et l'activité enzymatique de la p70 S6 kinase dans les CMLV [16]. La phosphorylation de la protéine ribosomique S6 par la p70 S6 kinase est intimement corrélée à l'effet stimulant des facteurs de croissance sur la traduction, ce qui s'expliquerait en partie par le rôle de la S6 dans le recrutement vers les polysomes des ARN messagers possédant une séquence riche en pyrimidine à leur extrémité 5' [28]. Le traitement des CMLV par la rapamycine, un inhibiteur sélectif de la p70 S6 kinase, entraîne une réduction marquée de la synthèse de protéines induite par l'Ang II, suggérant un rôle important de cette protéine kinase dans la réponse hypertrophique [16]. Plusieurs équipes ont rapporté que l'Ang II stimule puissamment l'activité enzymatique des MAP (*mitogen-activated protein*) kinases ERK1 et ERK2 (*extracellular signal-regulated kinase*) dans les CMLV et autres cellules cibles [16, 29]. En utilisant un inhibiteur sélectif de la voie enzymatique ERK1/ERK2, le composé synthétique PD98059, nous avons démontré que l'activation de cette voie est nécessaire à l'action stimulante des facteurs de croissance comme l'Ang II sur la synthèse de protéines dans les CMLV [30]. Cependant, le site d'action des isoformes de MAP kinase dans le contrôle de la synthèse des protéines n'est pas connu. Bien que le rôle de ces enzymes dans la régulation transcriptionnelle de certains gènes soit bien documenté, leur implication au niveau de la traduction demeure hypothétique. Fait intéressant, outre sa propriété de stimuler l'activité de protéine sérine/thréonine kinases, l'Ang II augmente également la phosphorylation des résidus tyrosine de plusieurs protéines suite à sa liaison au récepteur AT₁ [31, 32]. Nous avons identifié le substrat majeur comme étant la paxilline, une protéine de 68 kDa associée aux plaques d'adhérence focales de la cellule [33]. Parmi les autres protéines dont le niveau de phosphorylation des résidus tyrosine est augmenté par un

traitement par l'Ang II, on retrouve : p125^{FAK} (*focal adhesion kinase*), phospholipase C- γ 1, Shc, ERK1/ERK2, IRS-1 (*insulin receptor substrate 1*) et le récepteur du PDGF (*platelet-derived growth factor*). Il est intéressant de noter que ces protéines sont généralement phosphorylées en réponse à l'activation de récepteurs tyrosine kinases, suggérant ainsi l'existence d'effecteurs communs entre le récepteur AT₁ et les récepteurs à activité tyrosine kinase. L'identité de la (des) tyrosine kinase(s) impliquée(s) demeure inconnue, mais des travaux récents suggèrent que l'Ang II active au moins deux tyrosine kinases, la p125^{FAK} et une nouvelle tyrosine kinase cytosolique dépendante du Ca²⁺ [34]. Afin de définir le rôle de la phosphorylation sur des résidus tyrosine dans l'action hypertrophique de l'Ang II, nous avons traité des CMLV par la génistéine et l'herbimycine A, deux inhibiteurs sélectifs des tyrosine kinases. Les résultats de ces expériences ont clairement démontré que l'inhibition de la phosphorylation sur des résidus tyrosine abolit complètement l'induction de la synthèse de protéines par l'Ang II dans ces cellules [32]. En revanche, les inhibiteurs des tyrosine kinases n'interfèrent pas avec la stimulation de la phospholipase C, ou l'activation des MAP kinases ERK1/ERK2 et de la p70 S6 kinase. L'ensemble de ces résultats suggère que de multiples cascades de protéine kinases agissent de façon synergique pour contrôler la vitesse globale de synthèse de protéines.

Finalement, comme tous les facteurs de croissance, l'Ang II stimule l'induction des gènes de réponse précoces comme *c-fos*, *fosB*, *c-jun*, *egr-1* et *c-myc*, qui codent pour des facteurs de transcription [3, 18]. Le rôle de ces facteurs dans la réponse hypertrophique demeure spéculatif, mais il est probable qu'ils contrôlent la transcription de certains gènes de protéines de structure. Des travaux récents ont également montré que l'Ang II stimulait une activité de liaison à l'ADN de type SIF (*sis-inducing factor*) et augmentait la phosphorylation sur des résidus tyrosine du facteur de transcription STAT1 [35, 36]. Ces résultats font clairement apparaître des similitudes dans le mode d'action du récepteur AT₁ et dans

celui des récepteurs des cytokines et des récepteurs à activité de tyrosine kinase.

Récepteur AT₂ et croissance cellulaire

Des données récentes obtenues *in vivo* et *in vitro* suggèrent que le récepteur AT₂ pourrait jouer un rôle important dans les processus physiologiques et pathologiques de croissance rapide des tissus. Chez le rat, le récepteur AT₂ est abondamment synthétisé dans les tissus mésenchymateux du fœtus, dans le cerveau et les glomérules rénaux en cours de maturation, ainsi que dans le cœur et l'aorte au cours des premières semaines après la naissance [37]. Sa synthèse est quasiment réprimée chez l'adulte, mais augmente à nouveau de manière significative lors du processus de cicatrisation cutanée [38], après désendothélialisation de la paroi vasculaire et dans le cœur, au cours de l'hypertrophie ventriculaire gauche induite par une sténose de l'aorte thoracique [39].

Dans les cellules endothéliales coronaires de rats SHR, qui synthétisent simultanément les deux sous-types de récepteurs AT₁ et AT₂ dans les proportions respectives de 80 % et 20 %, la prolifération cellulaire induite par le FGF (*fibroblast growth factor*) est inhibée de manière dépendante de la dose par l'Ang II [40]. Cet effet anti-prolifératif est aboli en présence du PD123177 et non du losartan, suggérant qu'il s'exerce par l'intermédiaire des récepteurs AT₂. Cette hypothèse est renforcée par des expériences montrant que des cellules endothéliales coronaires quiescentes traitées par l'Ang II peuvent proliférer à condition que les récepteurs AT₁ soient actifs et les récepteurs AT₂ bloqués [40]. L'action antagoniste du récepteur AT₂ sur la prolifération cellulaire a également été observée dans des CMLV après transfection du gène du récepteur AT₂ (*m/s n°2, vol. 12, p. 264*) [41]. Enfin, des résultats préliminaires montrent que les myocytes cardiaques de rats nouveau-nés, qui synthétisent les deux types de récepteurs, développent une hypertrophie significativement plus importante en présence qu'en absence de PD123177 lorsqu'ils sont traités par l'Ang II pendant 72 heures [42]. Il est intéressant

RÉFÉRENCES

41. Nakajima M, Hutchinson HG, Fujinaga M, *et al.* The angiotensin II type 2 (AT₂) receptor antagonizes the growth effects of the AT₁ receptor: gain-of-function study using gene transfer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 10663-7.
42. Booz GW, Reiprith MJ, Baker KM. AT₂ receptor blockade augments angiotensin II-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Hypertension* 1995; 26: 547.
43. Janiak P, Pillon A, Prost JF, Vilaine JP. Role of angiotensin subtype 2 receptor in neointima formation after vascular injury. *Hypertension* 1992; 20: 737-45.
44. Yamada T, Horiuchi M, Dzau VJ. Angiotensin II type 2 receptor mediates programmed cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 156-60.
45. Hein L, Barsh GS, Pratt RE, Dzau VJ, Kobilka BK. Behavioural and cardiovascular effects of disrupting the angiotensin II type-2 receptor gene in mice. *Nature* 1995; 377: 744-7.
46. Ichiki T, Labosky PA, Shiota C, *et al.* Effects on blood pressure and exploratory behaviour of mice lacking angiotensin II type-2 receptor. *Nature* 1995; 377: 748-50.
47. Tsutsumi K, Saavedra JM. Heterogeneity of angiotensin II AT₂ receptors in the rat brain. *Mol Pharmacol* 1992; 41: 290-7.
48. Kang J, Posner P, Summers C. Angiotensin II type 2 receptor stimulation of neuronal K⁺ currents involves an inhibitory GTP binding protein. *Am J Physiol* 1994; 267: C1389-97.
49. Buisson B, Laflamme L, Bottari SP, de Gasparo M, Gallo-Payet N, Payet MD. A G protein is involved in the angiotensin AT₂ receptor inhibition of the T-Type calcium current in non-differentiated NG108-15 cells. *J Biol Chem* 1995; 270: 1670-4.
50. Siemens IR, Reagan LP, Yee DK, Fluharty SJ. Biochemical characterization of two distinct angiotensin AT₂ receptor populations in murine neuroblastoma N1E-115 cells. *J Neurochem* 1994; 62: 2106-15.
51. Dudley DT, Hubbel SE, Summerfelt RM. Characterization of angiotensin II (AT₂) binding sites in R3T3 cells. *Mol Pharmacol* 1991; 40: 360-7.
52. Lokuta AJ, Cooper C, Gaa ST, Wang HE, Rogers TB. Angiotensin II stimulates the release of phospholipid-derived second messengers through multiple receptor subtypes in heart cells. *J Biol Chem* 1994; 269: 4832-8.
53. Nahmias C, Cazaubon SM, Briend-Sutren MM, Lazard D, Villageois P, Strosberg AD. Angiotensin II AT₂ receptors are functionally coupled to protein tyrosine dephosphorylation in N1E-115 neuroblastoma cells. *Biochem J* 1995; 306: 87-92.
54. Sun H, Tonks NK, Bar-Sagi D. Inhibition of Ras-induced DNA synthesis by expression of the phosphatase MKP-1. *Science* 1994; 266: 285-8.

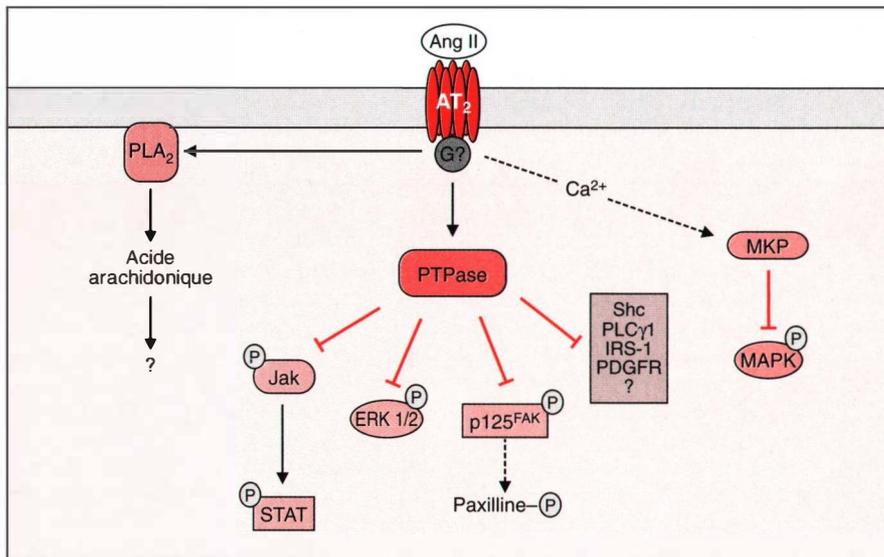


Figure 4. **Voies présumées de transmission du signal relayé par le récepteur AT₂ dans le contrôle de la croissance cellulaire.** La liaison de l'Ang II au récepteur AT₂ pourrait stimuler l'activité d'une protéine tyrosine phosphatase et entraîner la déphosphorylation et l'inactivation de protéines kinases et/ou d'effecteurs essentiels pour la synthèse d'ADN et de protéines. Nous avons également démontré que l'activation du récepteur AT₂ pouvait induire la synthèse de la protéine phosphatase à double spécificité MKP-1, une enzyme capable d'inactiver divers membres de la famille des MAP kinases. Finalement, l'activation du récepteur AT₂ provoque la libération d'acide arachidonique dans certains types cellulaires. Abréviations: PTPase, protéine tyrosine phosphatase; Jak, Janus kinase; MKP, MAP kinase phosphatase; MAPK, MAP kinase; PLA₂, phospholipase A₂.

de noter que l'effet anti-croissance relayé par le sous-type AT₂ se traduit de différentes manières selon le type de cellule: action antimitotique sur des cellules encore capables de se diviser, action antihypertrophique sur des cellules ayant perdu cette capacité, comme les myocytes cardiaques en phase terminale de différenciation. Certaines observations faites *in vivo* confortent aussi l'hypothèse d'une action anti-croissance du récepteur AT₂. Ainsi, chez le rat, l'hypertrophie intimale consécutive à une désendothéliation de la carotide est inhibée en présence de l'agoniste AT₂ CGP 42112A [43] et réduite de 70 % lorsque le récepteur AT₂ est produit localement de manière anormalement élevée après transfert *in vivo* du gène [41]. Donc, l'activation des récepteurs AT₂ pourrait exercer un effet de frein sur certains processus de croissance cellulaire rapide, contribuant ainsi à la régulation de l'homéostasie tissulaire. Des études réalisées sur les lignées cellulaires R3T3 et PC12W, ainsi que sur des cel-

lules de la granulosa ovarienne, suggèrent que l'effet antiprolifératif du récepteur AT₂ s'exercerait en partie par une induction de l'apoptose [44]. A ce stade, il est possible de formuler l'hypothèse selon laquelle le mode-lage des tissus au cours du développement foetal (organogenèse) et le remodelage tissulaire se produisant chez l'adulte lors de processus tumoraux, cicatriciels, ou au cours de l'hypertension artérielle sont en partie dépendants de l'Ang II, l'équilibre entre croissance, différenciation et apoptose cellulaire étant contrôlé par la prédominance de l'un ou l'autre des deux sous-types de récepteurs. Toutefois, l'hypothèse de la transmission par le récepteur AT₂ d'une action antiproliférative ou apoptotique de l'Ang II dans les situations de croissance rapide est en apparence contradiction avec la description récente de souris transgéniques nulles au locus du gène AT₂ (*m/s n° 1*, vol. 12, p. 122) [45, 46]. En effet, ces auteurs ont montré que l'inactivation du gène AT₂ n'induit ni dysfonction-

nement ni modification tissulaire au cours du développement embryonnaire. Les seules modifications décrites chez ces souris sont une diminution générale de l'activité motrice et une sensibilité accrue à l'effet vasopresseur de l'Ang II.

La principale question qui se pose maintenant est la suivante : par quel mécanisme la stimulation des récepteurs AT₂ interfère-t-elle avec la croissance cellulaire ? Pour y répondre, plusieurs groupes tentent d'identifier les voies de signalisation du récepteur AT₂. Puisque le récepteur AT₂ présente une structure à sept domaines transmembranaires, il est apparu logique de vérifier son couplage aux protéines G. Bien qu'apparemment simple, cette question reste encore sans réponse définitive. En effet, des études pharmacologiques utilisant des analogues du GTP ou la toxine de *Bordetella pertussis* ont montré que la sensibilité du récepteur AT₂ à ces agents varie selon le type tissulaire et/ou cellulaire. Dans la quasi-totalité des tissus fœtaux et neuronaux, et dans certains types de cellules, utérines, ovariennes, médullosurrénales, PC12W et fibroblastes R3T3, le récepteur AT₂ n'apparaît pas associé à une protéine G [6]. En revanche, des sites AT₂ synthétisés dans certaines zones spécifiques du cerveau présentent des caractéristiques pharmacologiques typiques des récepteurs couplés aux protéines G [47]. De même, dans des cultures primaires de neurones de rats nouveau-nés, l'augmentation des courants potassiques intracellulaires induite par l'activation du récepteur AT₂ fait intervenir une protéine G sensible à la toxine de *pertussis* [48]. Dans les cellules de la lignée NG108-15, la diminution des courants calciques relayée par le récepteur AT₂ dépendrait aussi d'une protéine G encore non identifiée [49]. Ces résultats controversés pourraient s'expliquer par l'existence possible de deux isoformes du récepteur AT₂ chez les rongeurs, l'une couplée aux protéines G et l'autre non [47, 50].

L'identité des effecteurs et second messagers impliqués dans l'action

régulatrice du récepteur AT₂ sur la croissance reste à déterminer. Dans les fibroblastes R3T3 et les cellules PC12W, la liaison de l'Ang II au récepteur AT₂ n'exerce aucun effet sur la production d'AMP cyclique, de GMP cyclique, d'inositol phosphates, d'acide arachidonique et de prostacycline, ni sur la mobilisation de Ca²⁺ intracellulaire [51]. En revanche, dans les myocytes cardiaques, l'activation du récepteur AT₂ stimule la libération d'acide arachidonique, probablement par l'intermédiaire de la phospholipase A₂ [52]. De même, l'activation du récepteur AT₂ entraîne des modifications des courants ioniques [48, 49] et une diminution de la concentration intracellulaire de GMP cyclique dans les cellules neuronales et PC12W [7]. Cependant, le lien existant entre ces événements biochimiques et la croissance cellulaire demeure obscur. D'autre part, une étude récente montre que l'activation du récepteur AT₂ provoque une diminution rapide et transitoire de la phosphorylation de résidus tyrosine de plusieurs protéines dans les cellules NIE-115 [53]. Sachant le rôle crucial de la phosphorylation de résidus tyrosine dans le contrôle de la croissance cellulaire, ces résultats suggèrent que l'action du récepteur AT₂ pourrait être relayée par une protéine tyrosine phosphatase. Une telle hypothèse a également été proposée pour expliquer les actions antiprolifératives de la dopamine et la somatostatine, également relayées par un récepteur à sept domaines transmembranaires. Dans ce contexte, nous avons récemment montré dans une lignée de fibroblastes de rat produisant de façon stable le récepteur AT₂ humain (Rat1-AT₂), qu'une stimulation par l'Ang II induit la synthèse de la protéine phosphatase MKP-1 après 30 et 60 minutes de traitement (C. Chasagne, S. Meloche, résultats non publiés). Cette protéine phosphatase, qui est codée par un gène de réponse précoce, bloque la synthèse d'ADN lorsque son gène est transfecté ou qu'elle est micro-injectée dans les cellules [54]. Des travaux sont actuelle-

ment en cours afin de définir les mécanismes d'induction du gène *MKP-1* et d'identifier les cibles de cette protéine phosphatase.

Perspectives

La découverte de l'existence de sous-types de récepteurs de l'Ang II et le développement d'antagonistes sélectifs de ces récepteurs ont permis de mieux caractériser les multiples actions de l'Ang II et ouvert de nouvelles perspectives pharmacologiques pour le traitement des maladies cardio-vasculaires. Ainsi, les expériences effectuées *in vitro* et *in vivo* ont clairement démontré que l'activation du récepteur AT₁ par l'Ang II augmente la synthèse globale de protéines et induit une hypertrophie cellulaire dans les CMLV et les myocytes cardiaques. D'autre part, des travaux récents suggèrent que le sous-type AT₂ pourrait exercer un effet anticroissance au niveau cellulaire (anti-prolifératif, anti-hypertrophique ou apoptotique selon le type cellulaire), s'opposant ainsi à l'action trophique relayée par le récepteur AT₁ ou à l'effet mitogénique d'autres facteurs de croissance. La caractérisation du rôle respectif des récepteurs AT₁ et AT₂ dans le contrôle de la croissance cellulaire s'avère d'une importance considérable du point de vue pharmacothérapeutique, puisque l'administration de losartan (antagoniste AT₁) entraîne une augmentation des concentrations circulantes d'Ang II chez l'homme. Ainsi, si le récepteur AT₂ interfère réellement avec la croissance cellulaire, les bloqueurs AT₁ pourraient présenter un avantage pharmacologique en exerçant un double effet bénéfique sur la prévention de l'hypertrophie vasculaire et cardiaque.

TIRÉS À PART

S. Meloche.

Summary

Signal transmission and cellular growth mediated by angiotensin II receptors

Angiotensin II (Ang II) is a peptide hormone that evokes a wide range of biological actions on the cardiovascular, renal and central nervous systems. The effects of the hormone are initiated by its interaction with two pharmacologically distinct subtypes of receptors, designated AT₁ and AT₂. Both receptors belong to the superfamily of seven transmembrane domains receptors. In addition to its classical actions, Ang II exerts growth promoting effects on diverse cell types, such as vascular smooth muscle cells (SMC) and cardiac myocytes. In vascular SMC, Ang II induces cellular hypertrophy as a result of increased protein synthesis, but has no effect on cell proliferation. This trophic effect is mediated by the AT₁ receptor subtype and results from regulatory changes at the levels of transcription and translation. The binding of Ang II to the AT₁ receptor stimulates the production of various second messengers which then propagate the signal towards a complex network of protein kinases. We have shown that the enzymatic activation of three independent protein kinase cascades, p70 S6 kinase, ERK1/ERK2 subfamily of MAP kinases and a tyrosine kinase, is necessary for a full stimulatory effect of Ang II on protein synthesis. On the other hand, recent studies suggest that the interaction of Ang II with the AT₂ receptor subtype might inhibit the growth of certain cell types. The signaling mechanisms of the AT₂ receptor remain to be established.



MOSAÏQUES
Association
des « X fragile »

77, rue Raspail
92270 Bois-Colombes, France
Tél./Fax : 01 47 60 24 99

le samedi 22 mars 1997
au CNIT-EXPO

(amphithéâtre GOETHE)
2, place de la Défense
92503 PARIS LA DÉFENSE
sur le thème :

LE SYNDROME DE L'X FRAGILE,
aspects génétiques,
cliniques et thérapeutiques

avec la participation de :

Dr Éric Fombonne,
Président du Conseil Scientifique
Dr Christophe-Loïc Gérard (Paris)
Pr Randi J. Hagerman (Denver USA)
Pr Jean-Louis Mandel (Strasbourg)
Pr Arnold Munnich (Paris)
Pr Gérard Ponsot (Paris)
Pr Allan Reiss (Baltimore USA)
Pr Bernadette Rogé (Toulouse)
Dr Jeremy Turk (London)