

## De la structure de la rénine à la conception d'inhibiteurs

Le blocage du système rénine semble actuellement l'un des principaux moyens de traiter l'hypertension artérielle. La masse d'informations accumulées ces dernières années sur la rénine et son gène permet maintenant d'envisager la synthèse d'inhibiteurs très spécifiques de cette enzyme.

### Pierre Corvol

Professeur à la faculté Broussais-Hôtel Dieu  
Directeur de l'unité 36 de l'Inserm.

### Joël Ménard

Professeur à la faculté Broussais-Hôtel Dieu.  
Chef de service à l'hôpital Broussais.

Plus de quatre vingts ans se sont écoulés entre la découverte de l'effet presseur d'un extrait de rein par Tigerstedt et Bergman et celle de la structure de la rénine et de son précurseur. En 1982, étaient publiées la première structure primaire d'une rénine, la rénine sous-maxillaire de souris [1] et la séquence nucléotidique de son gène structural [2]. La structure de l'ADN complémentaire (ADNc) de la rénine rénale humaine était élucidée deux ans plus tard [3], permettant ainsi de déduire la structure primaire de la rénine et de son précurseur. Le site catalytique de la rénine était connu et des modèles tridimensionnels de la rénine ont été proposés, conduisant à une recherche rationnelle d'inhibiteurs. Parallèlement à ces progrès spectaculaires par leur rapidité, le traitement de l'hypertension était bouleversé par l'apparition des inhibiteurs de l'enzyme de conversion [4] (*figure 1, p. suivante*). Leur utilisation montrait que la rénine était l'un des éléments essentiels de contrôle de la pression artérielle et probablement un facteur pathogénique important de l'hypertension artérielle essentielle. Le concept du blocage du système rénine-

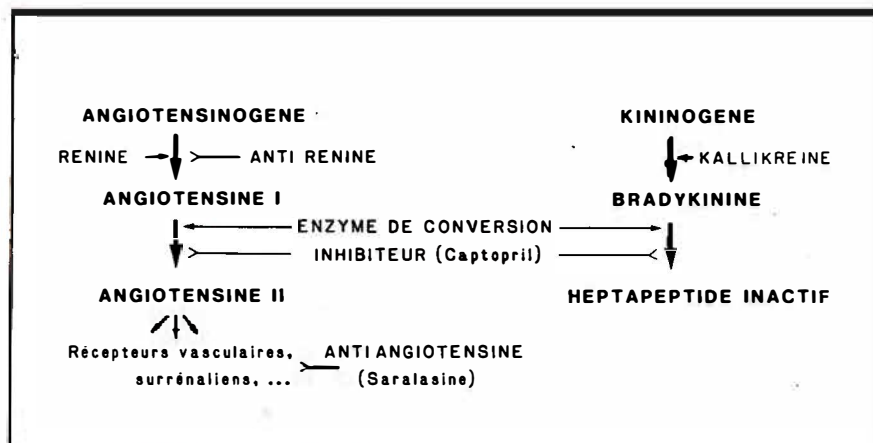
angiotensine dans le traitement de l'hypertension et de l'insuffisance cardiaque était inexistant avant 1975, puis ébauché par la découverte de peptides antagonistes de l'angiotensine II, et ensuite solidement étayé par la découverte des inhibiteurs de l'enzyme de conversion; il se doit d'être définitivement confirmé par l'utilisation des inhibiteurs sélectifs de l'étape limitante du système, la réaction rénine-angiotensinogène.

### Biologie moléculaire de la rénine

Structure du gène codant pour la rénine et déduction de la structure primaire de la rénine. Il était connu depuis longtemps qu'une enzyme similaire à la rénine était présente dans la glande sous-maxillaire de souris et qu'elle avait des propriétés physico-chimiques, enzymatiques et immunologiques semblables ou identiques à celles de l'enzyme rénale. Cette source extra-rénale de rénine offrait l'avantage de représenter environ 5% du contenu total en protéine de cette glande au lieu de moins de 0,001% dans le cas de l'enzyme rénale. Le taux important de rénine sous-maxillaire et de son ARN messenger

### ADRESSE

P. Corvol, J. Ménard : Inserm U 36, Pathologie vasculaire et endocrinologie rénale, 17, rue du Fer-à-Moulin, 75005 Paris.



## RÉFÉRENCES

- Misono KS, Chang JJ, Inagami T. Aminoacid sequence of mouse submaxillary gland renin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; 79 : 4858-62.
- Panthier JJ, Foote S, Chambrud D, Strosberg AD, Corvol P, Rougeon F. Complete aminoacid sequence and maturation of the mouse submaxillary gland renin precursor. *Nature* 1982; 298 : 90-2.
- Kageyama R, Ohkubo H, Nakanishi S, Murakami K. Cloning and sequence analysis of cDNA for human renin precursor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; 80 : 7405-9.
- Cushman DW, Cheung HS, Sabo EF, Ondetti MA. Design of potent competitive inhibitors of angiotensin-converting enzyme, carboxylalkanoyl and mercaptoalkanoyl aminoacids. *Biochemistry* 1977; 16 : 5484-91.
- Soubrier F, Panthier JJ, Corvol P, Rougeon F. Molecular cloning and nucleotide sequence of a human renin cDNA. *Nucleic Acids Res* 1983; 11 : 7181-90.
- Galen FX, Corvol MT, Devaux C, et al. Renin biosynthesis by human tumoral juxtaglomerular cells. Evidences for a renin precursor. *J Clin Invest* 1984; 73 : 1144-55.
- Bouhnik J, Fehrentz JA, Galen FX, et al. Immunologic identification of both plasma and human renal inactive renin as prorenin. *J Clin Endocrinol Metab* 1985; 60 : 399-401.
- Kim SJ, Hirose S, Miyazaki H, et al. Identification of plasma inactive renin as prorenin with a site-directed antibody. *Biochem Biophys Res Commun* 1985; 126 : 641-5.
- Holm I, Ollo R, Panthier JJ, Rougeon F. Evolution of aspartyl proteases by gene duplication: the mouse renin gene is organized in two homologous clusters of four exons. *EMBO J* 1984; 3 : 557-62.
- Hardmann JA, Hort YJ, Catanzaro DF, et al. Primary structure of the human renin gene. *DNA* 1984; 3 : 457-68.
- Miyazaki H, Fukamizu A, Hirose S, et al. Structure of the human renin gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81 : 5999-6003.

Figure 1. *Cascade de réactions du système rénine-angiotensine et du système kallikréine-kinine.* La rénine agit sur l'angiotensinogène pour libérer l'angiotensine I, décapeptide inactif. L'enzyme de conversion (dicarboxypeptidase) hydrolyse l'angiotensine I en angiotensine II, peptide vasopresseur et à effet antinatriurétique via la sécrétion d'aldostérone. La kallikréine libère à partir du kininogène la bradykinine, un nonapeptide vasodilatateur et natriurétique. La même enzyme de conversion hydrolyse la bradykinine en un peptide inactif. L'inhibition de l'enzyme de conversion par le captopril aboutit donc à l'inhibition de la production d'angiotensine II, vasconstrictrice et à l'accumulation de bradykinine, vasodilatatrice. Les antirénines inhibent spécifiquement la première étape du système rénine-angiotensine et n'affectent pas le système kallikréine-kinine.

(ARNm) ainsi que l'existence d'une différence entre les gènes rénine de deux souches de souris ont permis l'isolement de l'ARNm de la rénine et la caractérisation de clones recombinants contenant l'ADNc de la rénine. Panthier et coll. [2] ont ainsi pu déterminer la séquence nucléotidique complète du précurseur de la rénine sous-maxillaire de souris et en déduire son enchaînement en acides aminés. Au même moment, Misono et coll. [1] rapportaient la séquence primaire de la forme active de la rénine sous-maxillaire de souris par séquençage traditionnel protéique. La comparaison de ces séquences permet de déterminer la longueur du précurseur de la rénine et de proposer un modèle pour sa maturation [2].

La structure du précurseur de la rénine humaine a été déterminée par une approche similaire en utilisant l'ADNc de la rénine sous-maxillaire de souris pour cribler des banques d'ADNc de rein humain [3, 5]. Une importante homologie (68%) existe entre la structure primaire de la rénine humaine et celle

de la rénine sous-maxillaire de souris. La rénine sous-maxillaire de souris n'est pas glycosylée tandis que la rénine humaine, qui a une destinée plasmatique, présente deux sites potentiels de N-glycosylation (figure 2).

**Maturation du précurseur de la rénine : Préprorenine → Prorenine (inactive) → Rénine (active).** La maturation de la rénine implique au moins deux événements séparés (figure 2) : (a) Un peptide signal (prépeptide) est tout d'abord libéré par une signal peptidase de maturation pour produire la prorenine. La longueur exacte de ce peptide n'est pas connue avec certitude puisque le résidu NH<sub>2</sub>-terminal de la prorenine n'a pas été encore déterminé. (b) La prorenine sous-maxillaire de souris est ensuite clivée en deux endroits pour donner la rénine active mature, contenant deux chaînes liées entre elles par un pont disulfure entre les cystéines 320 et 357. Chacun des clivages protéolytiques intervient après un peptide dibasique : (Lys<sub>62</sub>-Arg<sub>63</sub> et Arg<sub>352</sub>-Arg<sub>353</sub>). Il n'y a pas de maturation ultérieure de l'extrémité

C-terminale de la chaîne B tandis que les acides aminés Arg<sub>352</sub> et Arg<sub>353</sub> de la chaîne A sont excisés ultérieurement.

La maturation précise de la rénine humaine rénale n'est pas connue puisque les résidus NH<sub>2</sub>-terminaux de la pro-rénine et de la rénine mature n'ont pas été déterminés. Toutefois, il est vraisemblable que la maturation du précurseur humain soit superposable à celle de la rénine de souris du fait de la similarité de sa structure primaire avec celle de la rénine de souris, aux sites supposés de clivage (figure 2). La rénine « inactive » humaine trouvée dans le plasma (60 à 80 % de la rénine totale) et dans le rein est vraisemblablement la pro-rénine. Des expériences de biosynthèse en culture cellulaire ont en effet montré la conversion d'un précurseur de haut poids moléculaire en une rénine active de plus faible poids moléculaire. Cette conversion intervient dans les granules sécrétoires des cellules de l'appareil juxta-glomérulaire [6]. En outre, des anticorps produits contre des peptides dérivés du profragment de la rénine humaine reconnaissent la rénine inactive quelle que soit son origine, rénale, amniotique ou plasmatique [7, 8].

La rénine appartient à la famille des protéases acides. Cette classe de protéines comporte la pepsine, la chymosine, la pénicillopepsine, la cathepsine D. La comparaison des séquences primaires montre l'importante homologie qui existe entre la rénine et les protéases acides (39 % entre la rénine et la cathepsine D et 37 % entre la rénine et la pepsine [2]). Pour tous les membres de la famille des protéases acides, la plus grande homologie existe dans la région des deux acides aspartiques impliqués dans le site catalytique (figure 3). La séquence de la rénine Asp<sub>101</sub>-Thr-Gly-Ser et Asp<sub>286</sub>-Thr-Gly a été trouvée dans toutes les séquences de protéases acides analysées jusqu'à présent.

Récemment, les études de l'organisation du gène de la rénine sous-maxillaire de souris [9] et humaine [10, 11] ont montré que le gène rénine comportait essentiellement deux blocs de quatre exons disposés

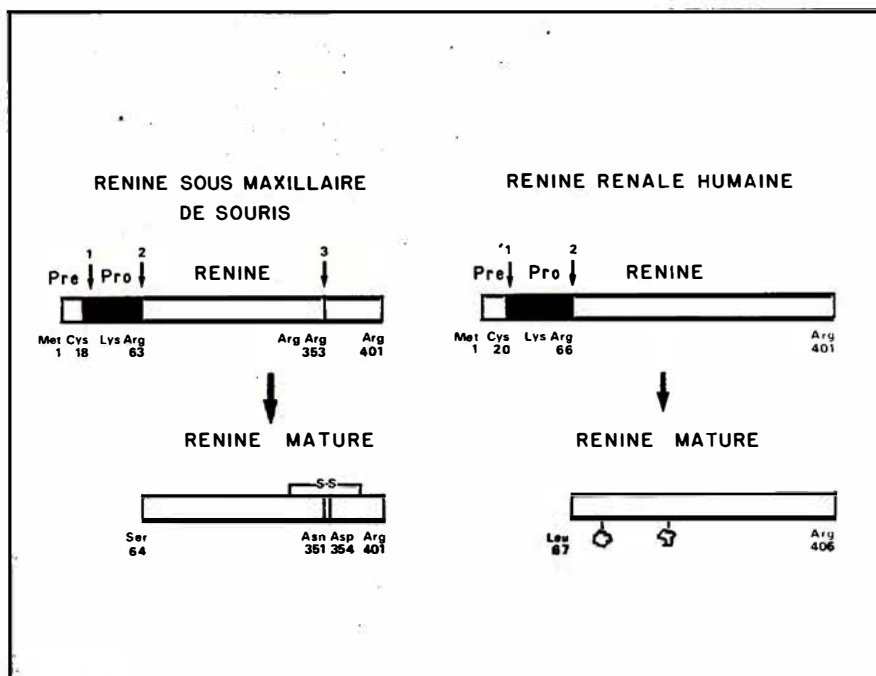


Figure 2. *Maturation de la rénine sous-maxillaire de souris et de la rénine rénale humaine.* La rénine est biosynthétisée sous forme de pré-rénine. Un premier clivage (1) libère le pré-peptide (ou peptide signal). Un deuxième clivage (2) produit la rénine mature (rénine active) à partir de la pro-rénine (rénine inactive). Ce deuxième clivage intervient dans les granules sécrétoires des cellules juxta-glomérulaires. La rénine sous-maxillaire a deux chaînes liées par un pont disulfure tandis que la rénine humaine n'a qu'une seule chaîne mais possède deux sites de glycosylation.

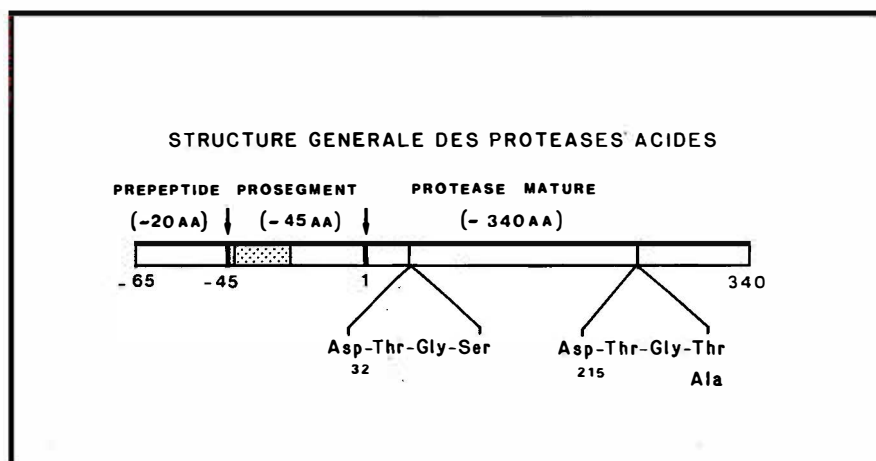


Figure 3. *Structure schématique générale des protéases acides.* Cette classe de protéines est biosynthétisée sous la forme d'une pré-enzyme. La proenzyme (pro-rénine, pepsinogène, prochymosine...) est inactive et est activée par clivage du prosegment. La partie NH<sub>2</sub>-terminale de ce prosegment (en rosé) inhibe l'activité enzymatique de la protéine mature. Toutes les protéases acides ont deux acides aspartiques directement impliqués dans le site catalytique de l'enzyme (Asp<sub>32</sub> et Asp<sub>215</sub> dans la numérotation de la pepsine). Noter l'homologie de séquence des acides aminés qui suivent les deux acides aspartiques dans toute la famille des protéases acides.



symétriquement et codant chacun pour un lobe de la protéine. Ces travaux étayent l'hypothèse que Tang *et coll.* [12] avaient formulée sur l'évolution des protéases acides à partir des données cristallographiques obtenues chez la pepsine d'*endothia* et *rhizopus chinensis* (aspartyl, protéases provenant de microorganismes), montrant que ces protéines possédaient une structure bilobale avec une faille bien définie et suggérant qu'elles avaient évolué après duplication puis fusion d'un gène ancestral unique.

Le fait que la rénine appartienne à la famille des protéases acides a des conséquences importantes pour la recherche d'inhibiteurs. Si la structure tertiaire exacte de la rénine n'est pas connue, il est toutefois possible, en se fondant sur les coordonnées cristallographiques des autres protéases acides, d'établir des modèles de la structure tridimensionnelle de la rénine sous-maxillaire de souris et de la rénine humaine [13]. De tels modèles n'ont pas la précision de véritables données cristallographiques mais permettent d'établir des hypothèses sur la structure du site catalytique et des sous-sites d'interaction avec le substrat (figure 4). Étant donnée la similarité du site actif de la rénine avec celui des autres protéases acides, on peut prévoir la difficulté d'inhiber spécifiquement la rénine. Le mécanisme d'inhibition des protéases acides au niveau même de l'attaque de la liaison peptidique est en effet univoque et la spécificité d'un inhibiteur résidera donc dans les sous-sites de reconnaissance de l'inhibiteur par l'enzyme.

La connaissance du gène de la rénine, de sa structure primaire, de son site actif et de son analogie avec les protéases acides permet ainsi d'établir une stratégie logique et opérationnelle pour la recherche d'inhibiteurs de la rénine humaine. Encore faut-il connaître la spécificité du système rénine-angiotensine chez l'homme.

### Spécificité enzymatique

La rénine n'a qu'un substrat connu, l'angiotensinogène. En effet, à l'inverse des autres protéases acides qui

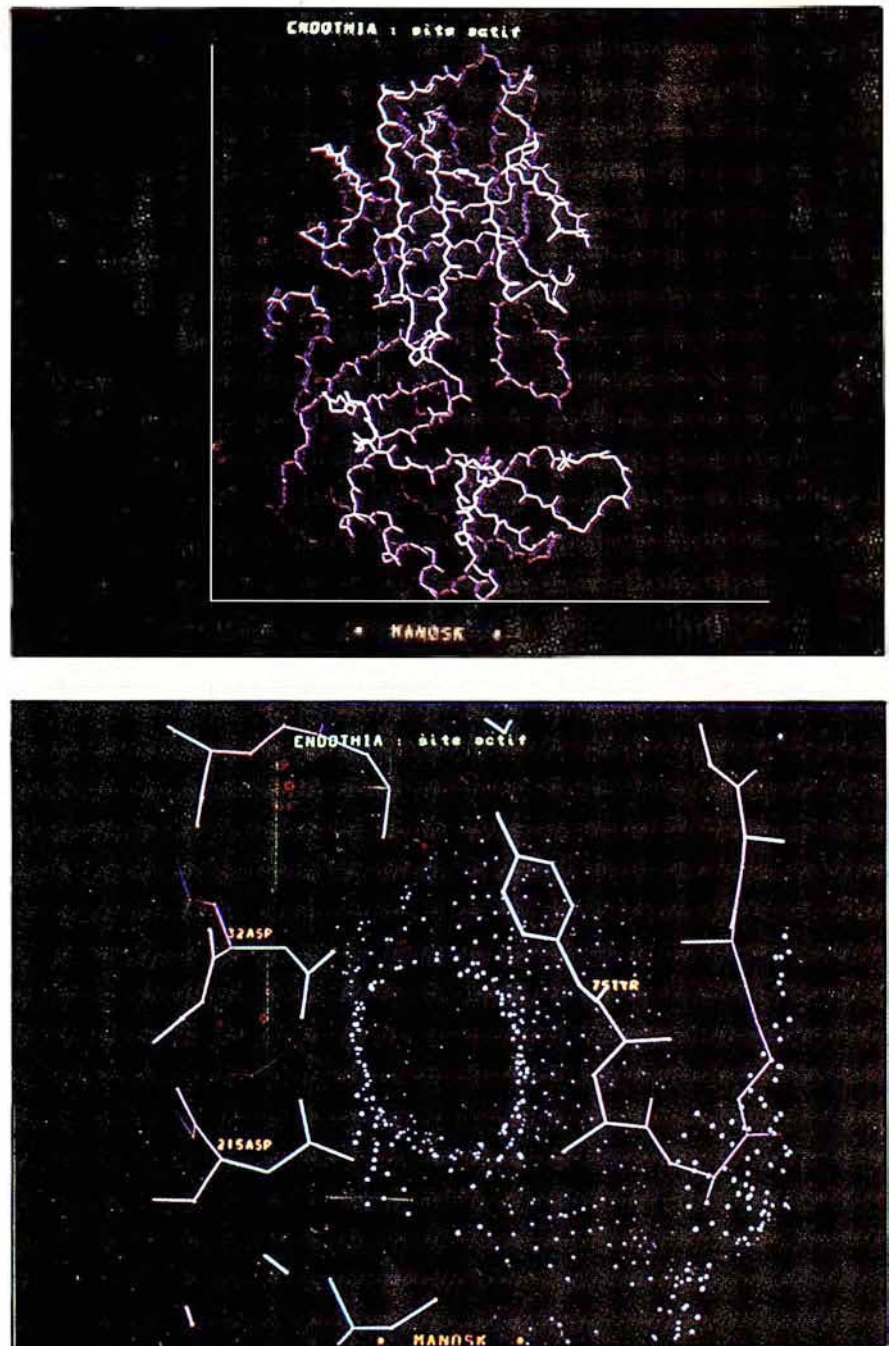


Figure 4. **Modélisation tridimensionnelle d'une protéase acide (Endothiapepsine).** C'est à partir de telles structures que peuvent être modélisées, dans un deuxième temps, les rénines de souris et humaine permettant la recherche d'inhibiteurs du site catalytique. Ce travail a été réalisé grâce au programme Manosk (Dr J. P. Mornon, Cnrs Paris VI, laboratoires de minéralogie et cristallographie).

(A) Architecture générale de la protéase à acides aspartiques, Endothiapepsine issue d'*Endothia Parasitica* (coordonnées du Pr. T. Blundell déposées à la Protein Data Bank). Seule la chaîne principale de la protéine est représentée afin de simplifier la photographie. Les deux domaines sont clairement visibles en haut et en bas, avec le site actif courant horizontalement au centre, d'un bord de la protéine à l'autre. Le site catalytique se trouve en plein centre derrière le feuillet bêta mobile visible verticalement au milieu de la photographie.

(B) Gros plan sur le site catalytique. Le substrat occupe la zone elliptique visible au centre et coupe à cet endroit la longue vallée du site actif.

clivent une large variété de substrats, la rénine n'agit que sur l'angiotensinogène pour former de l'angiotensine I. Skeggs a bien montré que non seulement la rénine de porc ne coupe que la liaison Leu<sub>10</sub>-Leu<sub>11</sub> du tétradécapeptide synthétique porcin représentant les 14 acides aminés NH<sub>2</sub>-terminaux de l'angiotensinogène, mais que le peptide minimum reconnu et clivé est l'octapeptide His<sub>6</sub>-Tyr<sub>13</sub>. Toute suppression d'un acide aminé supplémentaire du côté C- ou N-terminal aboutit à une augmentation brutale du Km\* d'un ordre de grandeur, c'est-à-dire à une affinité bien moindre de la rénine pour le peptide. Ces expériences montrent la très haute spécificité de la rénine, qui est due à l'interaction des acides aminés du substrat entourant le site de clivage Leu<sub>10</sub>-Leu<sub>11</sub> avec des sous-sites de la rénine.

La rénine humaine n'a que très peu d'affinité pour l'angiotensinogène de rat ou de chien qu'elle n'hydrolyse que très lentement. Une des raisons de la spécificité de la rénine humaine pour l'angiotensinogène humain tient en partie à la séquence N-terminale de l'angiotensinogène humain qui diffère notablement de

celle de l'angiotensinogène de rat et de porc au niveau du site de clivage (Leu<sub>10</sub>-Val<sub>11</sub>) et des acides aminés qui suivent immédiatement du côté C-terminal (figure 5).

### Spécificité immunologique

L'autre caractéristique de la rénine humaine est sa spécificité immunologique. Les anticorps polyclonaux et monoclonaux obtenus contre la rénine humaine ne reconnaissent ni les autres protéases acides, ni les rénines d'autres espèces, à l'exception de celle des primates. Ces anticorps anticatalytiques ne sont pas des inhibiteurs compétitifs et n'interagissent pas avec les deux aspartates du site actif. Ils sont probablement dirigés contre l'accès au site catalytique, ce qui expliquerait pourquoi ils n'inhibent ni les autres protéases acides ni les rénines d'autres espèces [14].

### Conséquences

Toutes ces observations indiquent la difficulté de la recherche d'inhibiteurs de la rénine : ils devront être suffisamment grands pour occuper les nombreux sous-sites d'interaction avec l'enzyme; il faudra les calquer au départ sur la structure de l'angiotensinogène humain pour obtenir des inhibiteurs de rénine

humaine, ce qui n'a été réalisé que tardivement; il faudra les tester dans un système in vitro de rénine humaine (ou de primate) agissant sur l'angiotensinogène humain. L'expérimentation in vivo devra se faire principalement chez le primate dont la rénine présente de nombreuses similarités, notamment immunologiques, avec la rénine humaine.

### Les inhibiteurs de la rénine

(a) Les anticorps anti-rénine humaine. La rénine règle le niveau tensionnel en fonction du régime sodé. La rénine contrôle la pression artérielle chez l'animal normotendu, en régime normosodé. Des anticorps polyclonaux ou monoclonaux anticatalytiques administrés chez le marmouset normotendu et vigile abaissent la pression artérielle en régime normosodé d'environ 15 mmHg. En régime désodé, l'abaissement de la pression artérielle est encore plus important (30 mmHg). On n'observe, dans ces conditions, ni accélération de la fréquence cardiaque, ni abaissement tensionnel en orthostatisme [15]. Fait important, l'administration par voie intraveineuse de téprotide, un inhibiteur de l'enzyme de conversion, abaisse la pression artérielle de façon similaire aux anticorps antirénine, en régime normosodé ou désodé (figure 6, p. suivante). Parallèlement, l'activité rénine plasmatique est supprimée et l'aldostérone plasmatique est abaissée. Ces expériences montrent qu'une administration aiguë d'un inhibiteur de la rénine possède le même effet hypotenseur que l'administration d'un inhibiteur de l'enzyme de conversion, cet effet étant potentialisé par la déplétion sodée. L'absence d'effet hypotenseur supplémentaire sous téprotide est un argument contre un rôle important de la bradykinine dans le mécanisme de l'abaissement tensionnel. Enfin, que le système rénine-angiotensine soit bloqué au niveau de la réaction rénine-angiotensinogène ou au niveau de l'enzyme de conversion, on ne note ni hypotension orthostatique, ni tachycardie, ceci indiquant l'absence de

\* Km = constante de Michaelis-Menten. Il s'agit d'une mesure de l'affinité d'une enzyme pour un ligand.

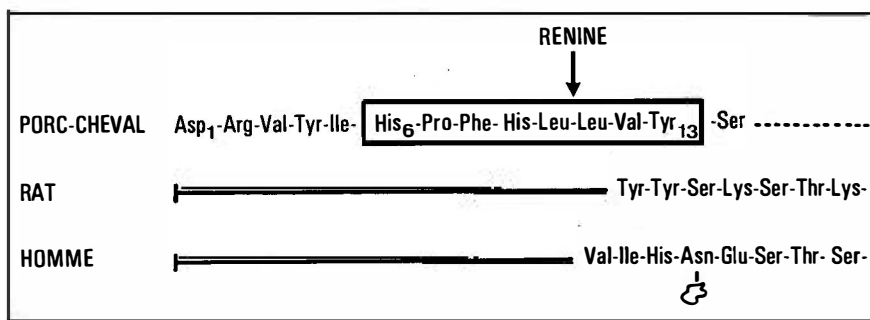


Figure 5. Structure NH<sub>2</sub>-terminale de l'angiotensinogène de porc, de rat et d'homme. La rénine coupe la liaison leucyl-leucyl dans le cas de l'angiotensinogène de porc, de cheval et de rat et la liaison leucyl-valyl dans le cas de l'homme. A noter un site potentiel de N-glycosylation dans l'angiotensinogène humain, proche du site de clivage de la rénine. L'octapeptide encadré His<sub>6</sub>-Tyr<sub>13</sub> est le substrat minimal reconnu par la rénine et qui a servi de base pour la synthèse d'inhibiteurs peptidiques dérivés du substrat (voir figure 7).

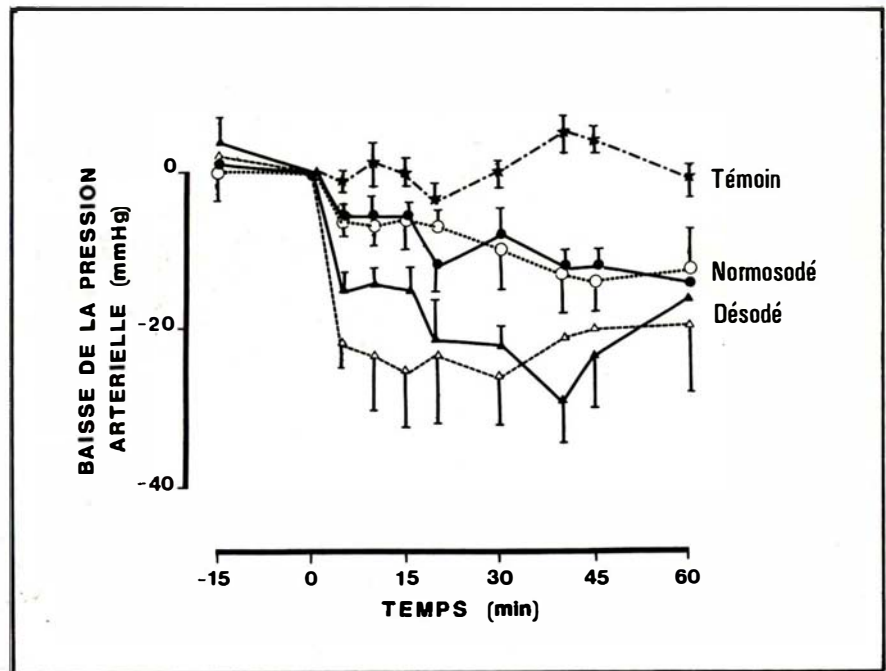


Figure 6. *Baisse de la pression artérielle chez le marmouset au cours de l'administration unique d'anticorps antirénine humaine et d'inhibiteur de l'enzyme de conversion.* Ces expériences ont été réalisées chez des marmousets conscients préalablement cathétérisés. L'injection de 0,2 ml de sérum de lapin non immun n'a aucun effet sur la pression artérielle ( $\times$  - - -  $\times$ ,  $n=2$ ). Chez l'animal normosodé, l'injection de 0,2 ml de sérum antirénine humaine ( $\bullet$ — $\bullet$ ,  $n=3$ ) ou de 2 mg/kg de téprotide ( $\circ$  - - -  $\circ$ ,  $n=4$ ) entraîne une baisse comparable de la pression artérielle de l'ordre de 15 mmHg. Chez l'animal soumis à une déplétion sodée pendant une semaine (régime désodé et lasilix), l'injection de la même dose de sérum antirénine ( $\blacktriangle$ — $\blacktriangle$ ,  $n=4$ ) entraîne une baisse de la pression artérielle de 30 mmHg analogue à celle obtenue par l'injection de 2 mg/kg de téprotide ( $\triangle$  - - -  $\triangle$ ,  $n=4$ ). Adapté de [15].

contre-réactions du système nerveux sympathique. Ces expériences sont d'une grande importance car elles confirment le rôle du système rénine dans le contrôle de la pression artérielle, même chez le primate normotendu en régime normosodé, et sont un puissant stimulus à la découverte d'inhibiteurs actifs par voie orale de la réaction rénine-angiotensinogène.

(b) Les fragments de la prorénine : des inhibiteurs « naturels ». La prorénine est un précurseur inactif de la rénine dont l'activité enzymatique est démasquée après libération du profragment de 46 acides aminés. Cette maturation de la prorénine en rénine est similaire à celle du pepsinogène inactif en pepsine. On a pu

montrer dans ce cas que plusieurs fragments peptidiques N-terminaux du pepsinogène étaient des inhibiteurs de la pepsine. Par analogie, Evin *et coll.* [16] ont émis l'hypothèse que la rénine pouvait être inhibée par des séquences peptidiques dérivées de son propre prosegment. Les peptides synthétiques correspondant aux séquences 15-19 et 16-20 des prorénines sous-maxillaire et humaine respectivement, s'avèrent être des inhibiteurs de la rénine avec un  $K_i^*$  de l'ordre de  $10^{-5}$ - $10^{-6}$  M. Les études de cinétique enzymatique montrent

\*  $K_i$  = constante d'inhibition.



une inhibition de type mixte. Par contre, les peptides situés à la partie C-terminale du prosegment (séquence 28-40) n'ont pas d'activité inhibitrice [17]. Il est donc vraisemblable qu'une partie du profragment interagit avec le reste de la molécule, à proximité ou dans le site actif en verrouillant l'accès au site catalytique.

**(c) Des analogues de l'état de transition du substrat de la rénine.**

Rich *et coll.* [18] ont étudié le mécanisme de l'hydrolyse de la liaison peptidique par les protéases acides et la rénine. Au cours de cette attaque par les deux aspartates et la molécule d'eau du site actif, le carbone plan de la liaison peptidique devient tétrahédrique. La liaison C-N étant relativement fragile, elle peut être attaquée par la molécule d'eau et hydrolysée. La synthèse d'une molécule mimant le carbone tétrahédrique mais où la liaison C-N sera remplacée par une liaison pratiquement non clivable, comme une liaison C-C, aboutira à bloquer le mécanisme catalytique des protéases acides. Pour obtenir un inhibiteur présentant une affinité et une spécificité suffisante vis-à-vis de la rénine, il faudra en plus mimer les sous-sites d'interaction de la rénine avec son substrat, de part et d'autre de l'analogue de l'état de transition. Les inhibiteurs actuels de la rénine comportent un analogue de l'état de transition de l'hydrolyse de la liaison peptidique par la rénine. La série la plus étudiée sur le plan théorique et expérimental est celle dérivée de la *pepstatine*. La *pepstatine* est un pentapeptide naturel isolé à partir de cultures d'actinomyces et a été découverte lors d'une recherche systématique d'inhibiteurs de la pepsine. Elle comporte un acide aminé particulier, la statine, possédant deux carbones asymétriques et dont seule la configuration 3S,4S est active. Parmi les deux statines de la *pepstatine*, seule la statine centrale joue le rôle essentiel d'un analogue de l'état de transition de l'hydrolyse enzymatique. Le rôle de cette statine centrale a été démontré par des expériences de raccourcissement progressif de la *pepstatine* et de substitution des acides aminés entourant la statine

centrale [19]. Du fait de sa structure, la *pepstatine* est un inhibiteur « universel » des protéases acides et présente en fait 10 000 à 100 000 fois moins d'affinité pour la rénine que pour la pepsine. La *pepstatine* elle-même a été peu utilisée chez l'animal d'expérience comme inhibiteur de la rénine du fait de sa faible solubilité et de son manque de spécificité. C'est en outre un médiocre inhibiteur de la rénine humaine ( $K_i$  environ  $10^{-5}$  M à pH 7,4).

La synthèse d'inhibiteurs plus spécifiques et plus affins pour la rénine humaine a été conçue en gardant la statine centrale comme inhibiteur du site catalytique des protéases acides et en remplaçant les acides aminés qui l'entourent par des acides aminés retrouvés dans l'angiotensinogène ou ayant une bonne affinité pour les sous-sites correspondants de la rénine. Dans cette approche la

statine centrale, du fait de ses deux carbonyl supplémentaires, remplace à elle seule le site de scission, le dipeptide Leu<sub>10</sub>-Val<sub>11</sub>. Le groupe hydroxyle-S<sub>3</sub> jouerait le rôle de l'intermédiaire de l'état de transition. Indépendamment, J. Boger *et coll.* [20] et G. Evin *et coll.* [21] ont synthétisé des peptides environ 1 000 à 10 000 fois plus affins pour la rénine humaine que la *pepstatine*, alors même que leur affinité s'abaissait notablement vis-à-vis de la pepsine (*figure 7*). Les sous-sites S<sub>2</sub> et S<sub>3</sub> ont un rôle essentiel à cet égard puisque le remplacement des deux valines précédant la statine centrale dans la *pepstatine*, par le dipeptide Phe-His correspondant Phe<sub>8</sub>-His<sub>9</sub> du substrat humain aboutit à un remarquable gain d'activité des composés [22]. Par contre, les sous-sites S'<sub>2</sub>, S'<sub>3</sub> et S'<sub>4</sub> semblent moins essentiels puisqu'ils

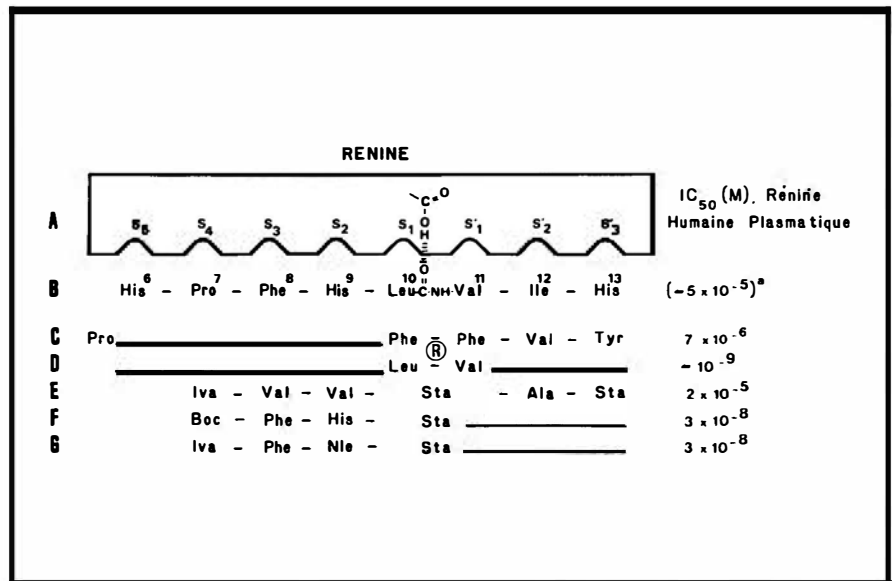


Figure 7. Sites d'interactions potentiels de la rénine humaine avec l'angiotensinogène humain. Conception de différents inhibiteurs. S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>... sont les sous-sites de liaison de la rénine (A) pour les acides aminés His, Pro, ... à gauche du site de clivage et S'<sub>1</sub>, S'<sub>2</sub>... les sous-sites pour les acides aminés à droite du site de clivage. (B) : structure de l'octapeptide correspondant à l'extrémité NH<sub>2</sub>-terminale de l'angiotensinogène humain. La rénine coupe la liaison leucyl-valyl; (C) : structures des premiers inhibiteurs synthétisés par Burton *et coll.*; (D) : analogues du substrat synthétisés par Webb *et coll.* [24] où la liaison CO-NH à cliver est remplacée par CH<sub>2</sub>-NH indiquée par (R) (liaison réduite) ou CH(OH)-CH; (E) : *pepstatine*; (F) et (G) : peptides continuant une statine centrale jouant le rôle d'intermédiaire de l'état de transition de l'hydrolyse enzymatique; (G) : SR 42128 [23]. (a) : constante d'affinité de la rénine pour l'octapeptide synthétique humain. IC<sub>50</sub> : concentration d'inhibiteur qui inhibe de 50% l'activité enzymatique.

## RÉFÉRENCES

12. Tang J, James MNG, Hsu IN, Jenkins JA, Blundell TL. Structural evidence for gene duplication in the evolution of acid proteases. *Nature* 1978; 271 : 618-21.
  13. Blundell T, Sibanda BL, Pearl L. Three-dimensional structure, specificity and catalytic mechanism of renin. *Nature* 1983; 304 : 273-5.
  14. Galen FX, Devaux C, Atlas S, et al. New monoclonal antibodies directed against human renin. *J Clin Invest* 1984; 74 : 723-35.
  15. Michel JB, Wood J, Hofbauer K, Corvol P, Menard J. Blood pressure effects of renin inhibition by human renin antiserum in normotensive marmosets. *Am J Physiol* 1984; 246 : F309-16.
  16. Evin G, Devin J, Castro B, Menard J, Corvol P. Synthesis of peptides related to the prosegment of mouse submaxillary gland renin precursor: An approach to renin inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81 : 48-52.
  17. Cumin F, Evin G, Fehrentz JA, et al. Inhibition of human renin by synthetic peptides derived from its prosegment. *J Biol Chem* 1985; 260 : 9154-7.
  18. Rich DH, Sun ETO, Ulm E. Synthesis of analogues of the carboxyl protease inhibitor pepstatin. Effect of structure on inhibition of pepsin and renin. *J Med Chem* 1980; 23 : 27-33.
  19. Rich DH, Salituro FG, Holladay MW. Design and discovery of aspartyl protease inhibitors. In: Vida JA, Gordon M, eds. *Conformationally directed drug design*. Am Chem Soc, 1984 : 213-37.
  20. Boger J, Lohr NS, Ulm EH, et al. Novel renin inhibitors containing the amino acid statine. *Nature* 1983; 303 : 81-4.
  21. Evin G, Devin J, Castro B, et al. New potent inhibitors of human renin. In: Hruby VJ, Rich DH, eds. *Peptides: Structure and Function, Proceedings of the 8th American Peptide Symposium*. Rockford: Pierce Chemical Company, 1984 : 583-6.
  22. Guegan R, Diaz J, Cazaubon C, et al. Pepstatin analogues as novel renin inhibitors. *J Med Chem* 1986 (sous presse).
  23. De Claviere M, Cazaubon C, Lacour C, et al. In vitro and in vivo inhibition of human and primate renin by a new potent renin inhibitor: SR 42128. *J Cardiovasc Pharmacol* 1985; 7 (suppl 4) : S58-61.
  24. Webb DJ, Cumming AMM, Leckie BJ, et al. Reduction of blood pressure in man with H142, a potent new renin inhibitor. *Lancet* 1983; ii : 1487.
- acceptent des acides aminés variés sans modification notable de l'activité. Ces peptides ont un  $IC_{50/0}^*$  de  $10^{-8}$ - $10^{-9}$  M in vitro vis-à-vis de la rénine humaine. Par voie intraveineuse, en bolus ou en perfusion chez le singe, ils abaissent la pression artérielle en fonction de la dose, bloquent l'activité rénine plasmatique et effondrent le taux d'angiotensine II [23]. Il existe un parallélisme entre leur effet hypotenseur et l'abaissement ou la suppression de l'activité enzymatique de la rénine. Comme les anticorps antirénine, ils agissent chez le primate normotendu en régime normo- ou désodé, avec un maximum d'effets en cas de déplétion sodée. La durée d'action de ces composés varie avec leur structure et la dose administrée : le pentapeptide Iva-Phe-Nle-Sta-Ala-Sta (SR 42128), à la dose intraveineuse de 3 mg/kg, abaisse pendant plus de 3 heures la pression artérielle du macaque et bloque pendant ce temps complètement l'activité rénine [23] (figure 8). D'autres peptides inhibiteurs de la rénine ont été synthétisés, notamment par Szelke et coll. L'un de ces peptides administré par voie intraveineuse chez des volontaires sains, en régime normosodé, abaisse la pression artérielle de 20 mmHg environ, inhibe l'activité rénine plasmatique et enfin supprime l'angiotensine II [24].

### Intérêts des substances antirénines

L'intérêt d'inhiber la réaction de la rénine sur son substrat doit se discuter essentiellement en fonction des résultats remarquables obtenus avec les inhibiteurs de l'enzyme de conversion dans l'hypertension expérimentale et humaine. Le blocage de la réaction de la rénine sur l'angiotensinogène a pour premier intérêt sa très grande sélectivité. Il n'y a pas d'autres substrats connus à la rénine que l'angiotensinogène alors que l'enzyme de conversion hydrolyse de nombreux autres substrats que l'angiotensine I, la bradykinine certes, mais aussi la

\*  $IC_{50/0}$ : inhibitory concentration (pouvoir inhibiteur).  $IC_{50/0}$  = concentration d'inhibiteur qui inhibe de 50% l'activité enzymatique.

substance P, les enképhalines, le facteur auriculaire natriurétique peut-être, etc. L'absence de super-sélectivité des inhibiteurs de l'enzyme de conversion soulève la question de la modification du métabolisme d'un autre peptide que l'angiotensine I par de tels inhibiteurs. A l'inverse de la rénine, l'enzyme de conversion se trouve localisée dans de multiples tissus (rein, poumon, intestin, testicule, cerveau...) où elle pourrait exercer des rôles différents suivant les substrats disponibles. Cette question est sans réponse actuellement.

L'accumulation d'angiotensine I sous inhibiteur de l'enzyme de conversion pourrait avoir un certain nombre de conséquences mal connues, parmi lesquelles celle d'induire des enzymes capables d'hydrolyser la partie C-terminale de l'angiotensine I en angiotensine II par deux clivages successifs. Ceci pourrait peut-être expliquer les taux non négligeables d'angiotensine II observés par certains auteurs lors de traitement chronique par inhibiteur de l'enzyme de conversion alors même qu'en administration aiguë on ne peut pas détecter l'angiotensine II. Il se pourrait, si cette hypothèse était vérifiée, qu'en fin de compte un plein effet hypotenseur ne puisse être obtenu avec les inhibiteurs de l'enzyme de conversion. Les substances antirénine se sont montrées aussi efficaces que les inhibiteurs de l'enzyme de conversion en administration aiguë et, comme eux, elles n'entraînent pas de contre-réactions de l'organisme à type d'activation réflexe du système nerveux sympathique, de chute de la pression en orthostatisme, de réduction de flux régionaux, de modification de l'inotropisme cardiaque. Il reste à voir si ces propriétés se maintiendront en administration chronique et même si les substances antirénine ne présenteront pas une activité hypotensive supérieure à celle des inhibiteurs de l'enzyme de conversion.

### Limites

La limite des inhibiteurs de la rénine sera vraisemblablement celle des inhibiteurs de l'enzyme de conversion. Nous avons vu que ces



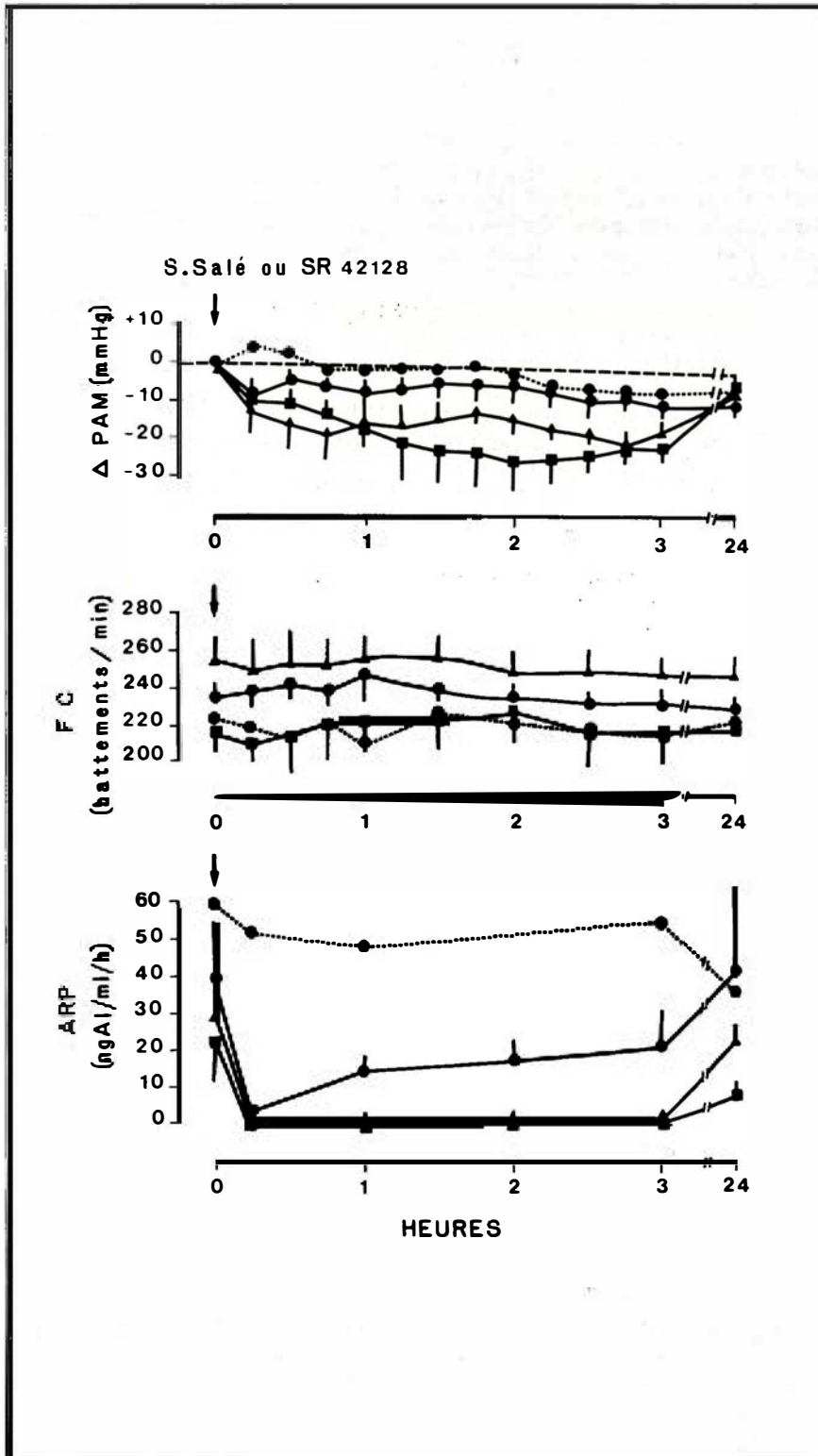


Figure 8. Modifications de la pression artérielle moyenne ( $\Delta$ PAM), de la fréquence cardiaque (FC) et de l'activité rénine plasmatique (ARP) chez le singe cynomolgus après administration d'une dose unique de sérum physiologique (=S. Salé) ( $\bullet$  - -  $\bullet$ ,  $n=12$ ); de SR 42128 : 1 mg/kg ( $\bullet$ — $\bullet$ ,  $n=3$ ), 3 mg/kg ( $\blacktriangle$ — $\blacktriangle$ ,  $n=3$ ) et 10 mg/kg ( $\blacksquare$ — $\blacksquare$ ,  $n=10$ ). Adapté de [23].

mjs n° 7, vol. 2, septembre 86

inhibiteurs sont d'autant plus efficaces que l'apport en sel est réduit. Cette ligne thérapeutique, que l'on fasse appel aux inhibiteurs de la rénine ou de l'enzyme de conversion, ne dispensera jamais d'une intervention sur les apports ou les éliminations sodées par les diurétiques. Une autre limite est inhérente au rôle primordial et téléologique de ce système sur la fonction rénale. Le rôle initial du système rénine dans la phylogenèse a été vraisemblablement celui d'assurer le flux plasmatique rénal et, plus tard, la filtration glomérulaire. Ce rôle, s'il est moins apparent chez les mammifères (car le maintien de la pression artérielle et de la volémie, via l'aldostérone, s'est développé), réapparaît dans certaines circonstances physiopathologiques schématiques telles que la sténose bilatérale des artères rénales (ou son équivalent, la sténose de l'artère d'un rein unique). Dans ces cas, le système rénine assure le maintien de la fonction rénale par vasoconstriction de l'artériole éfférente. L'inhibition de l'enzyme de conversion, et sans doute de la rénine, aboutit dans ces circonstances à une chute du flux plasmatique rénal et de la filtration glomérulaire.

### Avantages

Un des avantages du blocage du système rénine via l'enzyme de conversion ou la rénine, est l'absence de contre-régulations de l'organisme aboutissant à une limitation de l'effet hypotenseur. Ceci parce que l'angiotensine contrôle tout à la fois le système nerveux sympathique, les mécanismes d'excrétion de l'eau et du sel (vasopressine et aldostérone). Toutefois, il existe à l'intérieur du système rénine une régulation du taux de rénine par l'angiotensine II. Le blocage de la rénine aboutit, par une baisse du taux plasmatique d'angiotensine II, à une augmentation de la sécrétion de rénine. Cette contre-régulation observée sous inhibiteurs de l'enzyme de conversion, a été observée également sous inhibiteurs de la rénine chez des patients volontaires. Dans le cas des inhibiteurs de l'enzyme de conversion, l'angiotensine I aug-

mente sous captopril mais cette élévation du substrat n'a pas d'influence sur la cinétique de la réaction lorsque l'enzyme est inhibée. Par contre, l'élévation nette de l'enzyme, la rénine, et non plus du substrat en cas d'administration d'inhibiteur de la rénine exige un taux plasmatique élevé d'inhibiteur pour bloquer cette augmentation secondaire de la rénine. Enfin, et cette remarque est valable pour les inhibiteurs de la rénine comme pour ceux de l'enzyme de conversion, on n'a que peu d'informations sur la stimulation chronique des cellules juxtaglomérulaires lors de l'inhibition du système rénine-angiotensine. La baisse de l'angiotensine II induit une hypersécrétion de rénine, qui est elle-même secondaire à une augmentation de la transcription du gène, dont nous ignorons les conséquences à long terme.

### Futur

Le futur des inhibiteurs de la rénine dépend bien sûr de la possibilité de synthétiser des produits pour lesquels de nombreuses exigences sont requises : constante d'inhibition de l'ordre de la nanomole, spécificité vis-à-vis des autres protéases acides, longue durée d'action, bonne biodisponibilité, absence de toxicité. Cette synthèse s'avère difficile, mais elle bénéficie des apports des techniques modernes : connaissance de la structure primaire de la rénine, modélisation graphique de l'enzyme, cristallisation de l'enzyme obtenu par génie génétique et dissection des mécanismes réactionnels de l'hydrolyse de la liaison peptidique. Les modèles animaux existent et l'étude clinique de ces produits devrait être facilitée par nos connaissances sur l'inhibition de l'enzyme de conversion. Les inhibiteurs de la rénine auront-ils un effet thérapeutique inférieur, égal ou supérieur à celui des inhibiteurs actuels de l'enzyme de conversion ? Il est impossible de répondre à une telle question mais parions qu'un inhibiteur plus sélectif d'un système hautement spécifique et primordial de la régulation de la pression artérielle apportera un « plus » aux thérapeutiques déjà existantes ■

Ce travail n'a été possible que grâce à l'aide et à la collaboration de nombreux chercheurs et techniciens : J. Bouhnik, F. Cumin, G. Evin, F. X. Galen, J. Gardes, M. F. Gonzales, I. Laboulandine, J. B. Michel, et F. Soubrier (Inserm U36); B. Castro, J. A. Fehrentz, R. Seyer (Centre Inserm-Cnrs de Pharmacologie, Montpellier); B. Roques (Faculté de Pharmacie, Paris); F. Rougeon (Laboratoire de Biologie moléculaire, Institut Pasteur, Paris); J. P. Mornon (Université Paris VI, Laboratoire de Minéralogie Cristallographie, Paris); R. Guégan, J. Diaz, C. Cazaubon, M. Beaumont, C. Carlet, J. Clément, H. Demarne, M. Mellet, D. Nisato, J. P. Richaud, D. Segondy, M. Vedel, J. P. Gagnol et R. Roncucci (Sanofi Recherches, Montpellier).

### TIRÉS A PART

P. Corvol : Inserm U 36, Pathologie vasculaire et endocrinologie rénale, 17, rue du Fer-à-Moulin, 75005 Paris.

### Summary

A large body of new informations on the physiology, the pharmacology and the biochemistry of the renin angiotensin system has accumulated during these very last years. The blockade of renin as a way to treat hypertension is a concept which has emerged from our knowledge on the role of renin and from its structure. The primary structure of renin and that of its inactive precursor have been elucidated by protein sequencing and molecular cloning. Renin belongs to the class of aspartyl proteases, such as pepsin, cathepsin D and chymosin. Its tertiary structure and the organization of its catalytic center can be deduced by computer modelling from that of other aspartyl proteases which have been crystallized.

In vivo blockade of renin activity in primates by antihuman renin polyclonal antibodies or monoclonal antibodies directed against the active site produces a blood pressure decrease. The degree of blood pressure lowering is proportionnal to the intensity of the sodium depletion. The peptides designed to inhibit renin contain a transition state analog of the peptide bond as well as amino acids interacting with the subsites of the renin molecule. Extremely potent, specific and long lasting peptides or pseudo peptides have been synthesized and decrease blood pressure in vivo, both in monkeys and in humans.