

Maryvonne  
Baudouin-Legros  
Jean-Luc Paquet  
Pascale Guicheney  
Philippe Meyer

## Oncogènes et hypertension artérielle

*Les cellules musculaires lisses de rats atteints d'une hypertension spontanée prolifèrent de façon exagérée lors de leur stimulation par le sérum ou les facteurs de croissance. Leur phospholipase C est hyper-réactive et l'accumulation de messagers d'oncogènes nucléaires (c-myc, c-fos) est supérieure à celle observée dans les cellules d'animaux normotendus. Il se pourrait par conséquent qu'à un niveau ou à un autre certaines hypertensions artérielles génétiques soient liées à une anomalie des voies contrôlant la prolifération des cellules de la paroi vasculaire.*

**B**ien que la thérapeutique anti-hypertensive soit très efficace, les mécanismes fondamentaux de l'hypertension artérielle essentielle sont encore mal compris. Cette maladie, d'origine partiellement génétique et stimulée par certains facteurs socioculturels, se traduit par une augmentation de la résistance vasculaire périphérique [1]. Cette dernière est partiellement provoquée par l'hypercontractilité des cellules musculaires lisses vasculaires. Au cours de la dernière décennie la plupart des hypothèses pathogéniques ont été axées sur cette propriété. De fait, les altérations de transferts ioniques transmembranaires mises en évidence dans des cellules de sujets atteints d'hypertension essentielle ou de rats génétiquement hypertendus (en particulier le SHR, *spontaneously hypertensive rat*) [2] augmentent la concentration cytoplasmique de calcium libre et donc la réactivité des protéines contractiles. L'analyse plus fine des altérations vasculaires, des données nouvelles sur des altérations d'activité enzymatique, et la mise en évidence de régulations hormonales de l'expression d'un grand nombre de gènes dont les proto-oncogènes per-

mettent maintenant d'inclure les phénomènes nucléaires dans les schémas pathogéniques de l'hypertension artérielle essentielle.

### Altérations des parois vasculaires dans l'HTA

Les trois tuniques des parois artérielles sont lésées dans l'HTA, mais les troubles fonctionnels proviennent surtout de l'hypertrophie de la média. Les cellules musculaires lisses qui y sont contenues sécrètent en effet en quantité exagérée les protéines constituant la matrice extracellulaire ; elles sont elles-mêmes hypertrophiées et, au moins dans les artères musculaires, hyperplasiées [3].

Ces lésions anatomiques de l'hypertension artérielle (HTA) en constituent un élément pathogénique important car elles contribuent grandement à augmenter les résistances vasculaires et ne sont pas la seule conséquence de l'augmentation de pression : leur apparition accompagne l'élévation tensionnelle et leur blocage la retarde [4, 5]. Les activités prolifératives et sécrétoires des cellules musculaires lisses artérielles responsables de ces altérations anatomiques sont stimulées par divers

#### TIRÉS A PART

M. Baudouin-Legros.

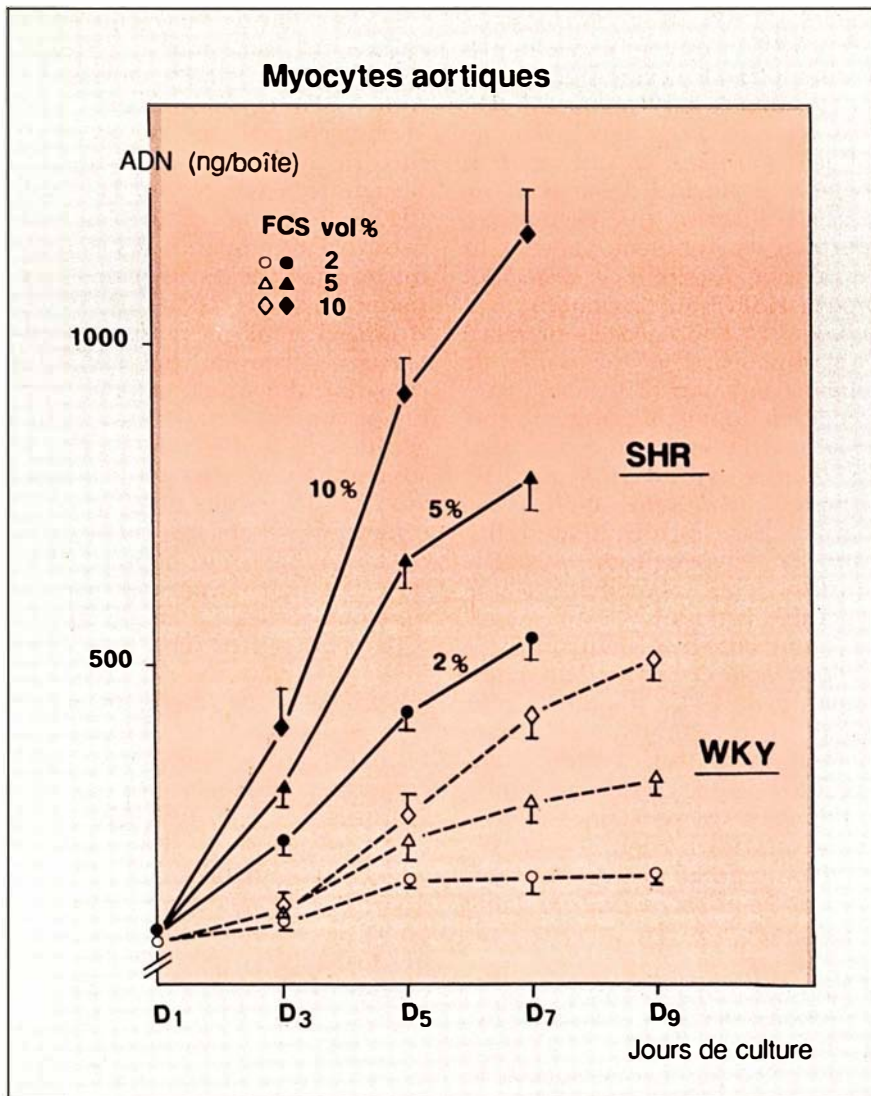


Figure 1. Croissance de cultures primaires de myocytes aortiques de rats hypertendus (SHR) (◆, ▲, ●) et normotendus (WKY) (◇, △, ○) en présence de concentrations variables de sérum de veau fœtal (FCS). (Baudouin-Legros M, Guicheney P, Meyer P. Am J Hypertension, sous presse).

facteurs locaux et circulants, et une sensibilité exagérée à ces « facteurs de croissance » a pu être mise en évidence dans l'hypertension artérielle d'origine génétique. Des cellules musculaires lisses aortiques de SHR mises en culture prolifèrent en effet plus rapidement et sont deux à trois fois plus nombreuses à confluence que des cellules d'animaux témoins normotendus [6, 8]. La prolifération est induite *in vitro* par des facteurs comme l'EGF (*epithelial growth factor*) ou le PDGF (*platelet-derived growth factor*) contenus dans le sérum de veau fœtal. Ces facteurs

sont sécrétés *in vivo* par les cellules de la paroi vasculaire et les cellules sanguines qui peuvent y adhérer ou y pénétrer : leur activité exagérée sur les cellules de SHR peut donc être cause de l'épaississement de la média observée dans la maladie.

Des agonistes vasoconstricteurs comme l'angiotensine II, la vasopressine ou la bradykinine stimulent aussi préférentiellement l'activité sécrétoire et même, dans certaines conditions, la prolifération des cellules aortiques de SHR [8, 9]. L'action nucléaire de ces substances est illustrée par mise en évidence (par

technique de *Northern blot*) de leur capacité d'induction de l'expression des proto-oncogènes nucléaires *c-jun*, *c-fos* et *c-myc* aussi bien dans les cellules en culture [10] que dans l'aorte d'animaux traités *in vivo* [11]. Les ARNm de ces trois oncogènes impliqués dans la prolifération cellulaire sont présents après des incubations de 30 minutes et d'une heure pour *c-jun* et *c-fos*, de une et de deux heures pour *c-myc*, et sont plus abondants dans les cellules de SHR [12]. L'exagération de la réponse mitogénique des myocytes de SHR peut expliquer les altérations des parois vasculaires de ces animaux ; l'hyper-réactivité de la phospholipase C membranaire récemment décrite dans l'HTA génétique animale et humaine permet d'en proposer une explication moléculaire.

### Hyper-réactivité de la phospholipase C dans l'HTA

L'importance de la phospholipase C (PLC) est liée au rôle fondamental des molécules (inositol trisphosphate et diacylglycérol) dont elle induit la formation à partir des phosphoinositides membranaires. L'inositol triphosphate libère le calcium des sites de réserve intracellulaires et le diacylglycérol active la protéine kinase C (PKC) qui phosphoryle un grand nombre de protéines sur des résidus sérine et thréonine. L'activation de la PLC provoque la contraction des myocytes par augmentation de la concentration cytoplasmique de calcium libre et phosphorylation de la kinase de la chaîne légère de la myosine. Le diacylglycérol produit physiologiquement le même effet que les esters de phorbol cancérogènes qui stimulent les proto-oncogènes *c-jun*, *c-fos* et *c-myc* par activation d'une séquence génomique spécifique [13]. L'élévation de la concentration de calcium contribue aussi à induire la prolifération de certaines cellules et l'ionophore calcique A23827 peut stimuler l'expression de *c-myc* [14]. Une hyper-réactivité de la PLC peut donc provoquer à la fois l'hypercontractilité et la prolifération exagérée des cellules musculaires lisses vasculaires du SHR. Cette anomalie enzymatique a d'abord été mise en évidence, sous stimulation par la

thrombine, dans les plaquettes de SHR [15] et de sujets atteints d'hypertension essentielle [16]. Elle existe également au niveau des cellules musculaires lisses aortiques de SHR : les agents vasoconstricteurs qui provoquent une plus forte action mitogénique sur ces cellules y provoquent aussi l'accumulation d'une plus grande quantité d'inositol triphosphate et de diacylglycérol que dans les cellules contrôles [8]. L'origine de cette hyper-réactivité de la PLC observée dans l'HTA n'est pas encore clairement établie, et il ne semble pas non plus qu'elle soit seule responsable de l'exagération de la prolifération cellulaire précédemment décrite. L'ensemble des résultats actuels suggère la participation d'un certain nombre de protéines codées par des oncogènes cellulaires dans la dysrégulation du processus mitogénique.

### **Implication des oncogènes dans la pathologie cellulaire de l'HTA essentielle**

Tout un faisceau d'arguments suggère que la PCL est activée, à la suite d'une interaction hormone-récepteur, par l'intermédiaire d'une protéine de type G-protéine. L'altération de l'une ou l'autre de ces réactions pourrait donc provoquer les troubles de l'hypertension essentielle. De fait, les récepteurs de l'angiotensine II sont plus nombreux dans les myocytes de SHR [12]. Ni la structure, ni le gène de ce récepteur ne sont encore connus. L'oncogène *c-mas* a été présenté comme remplissant cette fonction [17], mais ceci n'a pas été confirmé. La perspective que l'angiotensine, et éventuellement d'autres peptides vaso-actifs, aient des récepteurs codés par des oncogènes est néanmoins ouverte.

Des études de transfection cellulaire ont suggéré qu'une protéine p21 codée par un des proto-oncogènes de la famille *ras* pourrait agir comme G protéine intermédiaire entre les récepteurs et la PCL [18], et serait capable de favoriser l'action de tel ou tel type d'agoniste de l'enzyme [19, 20]. Cette hypothèse n'a pas été confirmée sur tous les modèles mais l'activation de la protéine kinase C

par les p21<sup>ras</sup> ou leur protéine associée (GAP) n'est en revanche pas discutée [21]. Or l'expression de *H-ras* est stimulée par l'angiotensine II, aussi bien *in vivo* qu'*in vitro* dans les cellules aortiques, ce qui pourrait suggérer l'existence d'une nouvelle boucle régulatrice. Les agents vasoconstricteurs stimulent d'autre part l'expression du gène de la *heat-shock protein* HSP70 qui se combine avec le produit de l'oncogène ou plutôt de l'anti-oncogène *p53* capable de contrebalancer *ras* [22], et une augmentation du nombre des récepteurs de la bradykinine a été décrite dans des cellules exprimant *Ki-ras* [20]. L'implication de cette famille d'oncogènes dans les altérations cellulaires de l'hypertension artérielle constitue donc actuellement une hypothèse de travail.

Un autre oncogène cellulaire peut moduler l'effet de la stimulation hormonale de la PLC : il s'agit de *c-src* codant pour une tyrosine kinase membranaire indépendante des récepteurs des facteurs de croissance. Ces kinases exercent un rôle très important dans le contrôle de la stimulation cellulaire, et des homologues ont été mises en évidence entre la protéine codée par *src* et la PLC 148 [23].

Néanmoins l'hyper-réactivité de la phospholipase C n'est pas, dans l'hypertension artérielle, la seule cause de la stimulation de la prolifération cellulaire : le sérum de veau fœtal qui stimule plus activement la croissance des myocytes de SHR que celle des animaux témoins provoque la même activation de PLC dans les deux types de cultures [12]. Le PDGF et l'EGF contenus dans le sérum sont d'ailleurs de mauvais agonistes de cette enzyme, et il est admis que leur action mitogénique repose surtout sur l'activité tyrosine kinasique de leur récepteur. L'existence, dans les cellules de SHR, d'anomalies portant sur le nombre ou l'activité de ces récepteurs est donc probable. Bien qu'elle n'ait pas été constamment retrouvée, une augmentation du nombre des récepteurs de l'EGF a été décrite dans les myocytes aortiques du SHR [24], mettant ainsi en cause l'oncogène *c-erbB*. Le nombre des récepteurs du PDGF est, quant à lui, modulé dans les cellules musculaires lisses vasculaires par l'état de la cul-

ture. La nature de cette régulation est encore indéfinie, mais la sécrétion, par ces mêmes cellules, de la chaîne A du PDGF et, dans certains cas, de la chaîne B codée par *c-sis*, en constitue un élément important [25]. L'étude de l'ensemble de « la voie du PDGF » dans les cellules de SHR devrait donc apporter des données intéressantes sur les anomalies fonctionnelles de ces cellules.

Il apparaît donc que plusieurs proto-oncogènes peuvent être impliqués dans les altérations cellulaires de l'hypertension artérielle d'origine génétique. Ces altérations du processus prolifératif existent d'ailleurs aussi sur des cellules non vasculaires comme les fibroblastes cutanés [26], ce qui souligne leur origine génétique. Des polymorphismes particuliers ont été décrits au niveau des gènes *c-fos* et *c-src* dans les cellules SHR [27], mais des surexpressions fonctionnelles des divers oncogènes sont également concevables. L'analyse des phénomènes nucléaires constitue clairement un élément indispensable à la recherche de la cause primitive de l'hypertension artérielle essentielle. Cette recherche devient, de ce fait, susceptible d'apporter des résultats concernant d'autres maladies, et en particulier l'oncogénèse ■

**M. Baudoin-Legros**  
chargée de recherche à l'Inserm.

**J.L. Paquet**  
thèse de pharmacologie.

**P. Guicheny**  
chargée de recherche à l'Inserm.

**Ph. Meyer**  
professeur de pharmacologie au  
CHU Necker.

Département de pharmacologie,  
Inserm U.7 / URA Cnrs 318, hôpital  
Necker, 161 rue de Sèvres,  
75015 Paris, France.

1. Folkov B, Grimby G, Thulesius O. Adaptive structural changes of the vascular walls in hypertension and their relation to the control of peripheral resistance. *Acta Physiol Scand* 1968 ; 50 : 671-7.
2. Baudouin-Legros M, Cloix JF, Crabos M, et al. Membrane markers of arterial hypertension. In: Zanchetti A, Tarazi RC, eds. *Eds Handbook of Hypertension*. Amsterdam: Elsevier, 1986 : 670-86.
3. Owens GK, Schwartz SM. Alterations in vascular smooth muscle mass in the spontaneously hypertensive rat: role of cellular hypertrophy, hyperploidy, and hyperplasia. *Circ Res* 1982 ; 51 : 280-9.
4. Loeb AL, Mandel HG, Straw JA, Bean BL. Increased aortic DNA synthesis precedes renal hypertension in rats. An obligatory step? *Hypertension* 1986 ; 8 : 754-61.
5. Gilligan JP, Spector S. Synthesis of collagen in cardiac and vascular walls. *Hypertension* 1984 ; 6 : 47-9.
6. Kanbe T, Nara Y, Tagami M, Yamori Y. Studies of hypertension-induced vascular hypertrophy in cultured smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1983 ; 5 : 887-92.
7. Grunwald J, Chobanian AV, Haudenschild CC. Smooth muscle cell migration and proliferation atherogenic mechanism in hypertension. *Atherosclerosis* 1987 ; 67 : 215-21.
8. Paquet JL, Baudouin-Legros M, Marche P, Meyer P. Enhanced proliferation activity of cultured smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertension* 1989 ; 2 : 108-10.
9. Berk BC, Vecshtein V, Gordfon HM, Tsuda T. Angiotensin II-stimulated protein synthesis in cultured vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 1989 ; 13 : 305-14.
10. Taubman MB, Berk BC, Isumo S, Tsuda T, Alexander RW, Nadal-Ginard B. Angiotensin II induces c-fos mRNA in aortic smooth muscle. *J Biol Chem* 1989 ; 526:30.
11. Moalic JM, Bauters C, Himbert D, et al. Phenylephrine vasopressin and angiotensin II as determinants of proto-oncogenes and heat-shock protein gene expression in adult rat heart and aorta. *J Hypertension* 1989 ; 7 : 195-202.
12. Baudouin-Legros M, Paquet JL, Brunelle G, Meyer R. Role of nuclear proto-oncogenes in SHR aortic smooth muscle cells proliferation. *J Hypertension* 1989 (sous presse).
13. Newmark P. Oncogenes and cells growth. *Nature* 1987 ; 327 : 101-2.
14. Lindsten T, June CH, Thompson CB. Multiple mechanisms regulate c-myc gene expression during normal T cell activation. *EMBO J* 1988 ; 7 : 2787-94.
15. Koutouzov S, Remmal A, Marche P, Meyer P. Hypersensitivity of phospholipase C in platelets of SHR. *Hypertension* 1987 ; 10 : 497-504.
16. Marche P, Koutouzov S, Girard A, Barbier P, Meyer P. Hyperresponsiveness of platelet phospholipase C in essential hypertension. *J Vasc Med Biol* 1989 (sous presse).
17. Jackson TR, Blair LAC, Marshall J, Goedert M, Hanley MR. The mas oncogene encodes an angiotensin receptor. *Nature* 1988 ; 335 : 437-40.
18. Fleischman LF, Chalwala SB, Cantley L. Ras-transformed cells altered levels of phosphatidylinositol 4,5 bisphosphate and catabolites. *Science* 1986 ; 231 : 407-10.
19. Olinger PL, Gorman RR. NIH 3T3 cells expressing high levels of the c-ras proto-oncogene display reduced PDGF-stimulated phospholipase activity. *Biochem Biophys Res Commun* 1988 ; 150 : 937-41.
20. Parries G, Hoebel R, Racker E. Opposing effects of a ras oncogene on growth factor-stimulated phosphoinositide hydrolysis: desensitization to platelet-derived growth factor and enhanced sensitivity to bradykinin. *Proc Nat Acad Sci USA* 1987 ; 84 : 2648-52.
21. Lacial JC, Fleming TP, Warre BS, Blumberg PM, Aaronson SA. Involvement of functional protein kinase C in the mitogenic response to Ha-ras oncogene product. *Mol Cell Biol* 1987 ; 7 : 4146-9.
22. Finlay CA, Hinds PW, Levine AJ. The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell* 1989 ; 57 : 1083-93.
23. Stahl ML, Ferenz CR, Kelleher KL, Kriz RW, Knopf JL. Sequence similarity of phospholipase c with the non catalytic region of src. *Nature* 1988 ; 332 : 269-72.
24. Scott-Burden T, Resink TJ, Baur U, Burgin M, Bulher FR. Epidermal growth factor responsiveness in smooth muscle cells from hypertensive and normotensive rats. *Hypertension* 1989 ; 13 : 295-304.
25. Valente AJ, Delgado R, Metter JD, et al. Cultured primate aortic smooth muscle cells express both the PDGF-A and PDGF-B genes but do not secrete mitogenic activity or dimeric platelet-derived growth factor protein. *J Cell Physiol* 1988 ; 136 : 479-85.
26. Guicheney P, Meyer P. Enhanced sensitivity to growth factors of sub-cutaneous fibroblasts from new-born spontaneously hypertensive rats. *J Hypertension* 1989 (sous presse).
27. Kotelevtsev YU, Brashishkita DA, Spitkovski DD, Kiselev FL, Postnov YU. Interstrain restriction fragment length polymorphism of c-fos and c-src oncogene loci in spontaneously hypertensive and normotensive rats. *J Hypertension* 1988 ; 6 : 779-81.

## Summary

### Oncogenes and arterial hypertension

Arterial wall hypertrophy observed in hypertension is now considered as a pathogenic feature of this disease. Its origin is not clearly defined, but, in essential hypertension appears to proceed from an intrinsic cell abnormality which consists in enhanced activity of several molecular reactions involved in both proliferation and contraction. Some proto-oncogenes are directly over-expressed, and other enzymatic activities, also impaired in « hypertensive » cells stimulated by vaso-active agents, are controlled by other proto-oncogenes-coded proteins. Abnormalities in nuclear functions have therefore to be included in hypertension pathogenesis.

## ASSOCIATION CLAUDE BERNARD

En 1989-1990, les Laboratoires de l'Association Claude Bernard organisent à nouveau des *Sessions d'Initiation aux modèles expérimentaux*.

Au total, il est prévu 28 Sessions, de 1 à 3 jours pour la plupart, portant sur des techniques et des méthodes pas encore couramment appliquées en Biomédecine et très diversement orientées.

Le programme peut être obtenu en écrivant à :

*Association Claude Bernard, Assistance Publique de Paris, 3, avenue Victoria, 75004 Paris, France*

ou en téléphonant au 40.27.35.93 ou 40.27.35.94.