

## Prorénine = rénine inactive ?

**L**a rénine qui n'a pas encore livré tous ses secrets est une protéase agissant sur un substrat, l'angiotensinogène, pour former un décapeptide, l'angiotensine I dépourvu d'effet biologique; ce peptide est ensuite transformé par l'enzyme de conversion en un octapeptide, l'angiotensine II qui entraîne notamment une vasoconstriction et une élévation de la pression artérielle. La synthèse de la rénine passe par la formation d'une préprorénine, d'une prorénine, composée de la rénine elle-même et d'un profragment supplémentaire de 46 acides aminés, et enfin de la rénine mature. On sait en outre que la rénine existe, en particulier dans le plasma, sous deux formes, inactive et active; la rénine inactive qui représente 50 à 80 % de la rénine totale plasmatique, est activable par le froid, par acidification ou par protéolyse partielle.

Quel rapport y a-t-il entre la prorénine et la rénine inactive? C'est à cette question que se sont attachés à répondre J. Bouhnik *et al.* [1]. A partir de la séquence nucléotidique de l'ADN complémentaire de la rénine humaine, les auteurs ont synthétisé un peptide de 13 acides aminés, dérivé du profragment de 46 acides aminés. Des anticorps dirigés contre ce peptide ont été obtenus chez le lapin. Dans des études d'immuno-absorption, ces anticorps se lient à la rénine inactive, rénale ou plasmatique, mais non à la rénine active. Cela signifie que la rénine inactive, rénale ou plasmatique, contient dans sa structure le profragment (ou au moins le fragment plus petit qui en dérive) du précurseur de la rénine et que la rénine active ne le contient plus. Ces résultats suggèrent que la rénine inactive pourrait bien être la prorénine elle-même.

Ce travail représente une nouvelle

étape dans l'analyse fine du système rénine-angiotensine. Depuis quelques années, des progrès remarquables ont été faits dans l'étude de ce système, notamment grâce à l'application des méthodes de la biologie moléculaire, et l'équipe de Pierre Corvol et Joël Ménard a apporté une contribution décisive en ce domaine. L'application de ces progrès à l'hypertension artérielle humaine est pour demain. **J.-P. G.**

1. Bouhnik J, Fehrenz JA, Galen FX, *et al.* Immunologic identification of both plasma and human renal inactive renin as prorenin *J Clin Endocr Met* 1985; sous presse.

## Mutations dirigées des protéines

**D**epuis l'aube des temps, l'évolution avait la vie devant soi. L'homme moderne est impatient : il a décidé de créer l'évolution instantanée.

Pour une attaque initiale dans cette voie, Rosenberg *et al.* (Chiron research lab.) ont jeté leur dévolu sur l' $\alpha_1$  antitrypsine. Plusieurs raisons militaient en faveur de ce choix. Cette protéine fait partie d'une famille qui dérive d'un ancêtre commun, dont chaque membre a acquis une spécificité raffinée. L'antitrypsine exerce son inhibition avant tout sur l'élastase, dont l'activité tend à réduire l'élasticité pulmonaire, favorisant le développement de l'emphysème. Enfin, on connaît un déficit génétique en antitrypsine, qui touche en Europe environ une personne sur 2000, et qui provoque des troubles respiratoires sévères. Cette protéine offre donc des possibilités thérapeutiques éventuelles.

L'antitrypsine est le chef de file d'une famille d'inhibiteurs de protéases à sérine. Elle comprend d'autres protéines plasmatiques, telles l' $\alpha_1$  antichymotrypsine, l'antithrombine, l' $\alpha_2$  antiplasmine.

Un facteur essentiel de la spécificité de chaque inhibiteur réside dans la nature d'un acide aminé du centre actif. L' $\alpha_1$  antitrypsine a en position 358 (sur 394 acides aminés en tout) une méthionine; l'acide aminé critique est une leucine dans l' $\alpha_1$  antichymotrypsine, une arginine dans l'antithrombine. Pour en confirmer l'importance, la nature s'est chargée d'une expérience extraordinaire qui d'ailleurs a fini tragiquement : un jeune garçon de Pittsburgh était porteur d'un mutant d' $\alpha_1$  antitrypsine dans lequel la méthionine 358 était remplacée par une arginine; la protéine avait perdu l'activité antitrypsine mais avait acquis une spécificité antithrombine; une augmentation de sa production survenait après chaque traumatisme, provoquant régulièrement des hémorragies dont la dernière ne put être maîtrisée.

L'antitrypsine est inactivée dans les poumons par des oxydants libérés par les leucocytes au cours des inflammations ou contenus dans la fumée des cigarettes. Le mécanisme de l'inactivation est probablement l'oxydation de la méthionine du centre actif en son sulfoxyde. On a donc pensé qu'en remplaçant la méthionine par un acide aminé moins susceptible à l'oxydation on pourrait rendre l'antitrypsine plus résistante. Encore fallait-il choisir un acide aminé dont la présence au centre actif ne détruirait pas l'activité. Des expériences antérieures faites sur des petits peptides avaient montré qu'une valine mise à la place d'une méthionine n'altérerait pas l'affinité pour l'élastase; c'est donc la valine qui fut choisie. Le codon de la méthionine est ATG; en substituant une guanine G à une adénine A on obtient GTG, codon de la valine. La difficulté est évidemment de cibler le A qu'il convient de changer. Ce ne fut pas là un travail facile. Nous ne donnerons que le principe de cette mutagenèse dirigée : elle emploie une chaîne de 30 nucléotides, synthétisée de façon à être calquée sur la partie intéressante de l'antitrypsine, mais contenant en bonne position la mutation souhaitée.

On a ainsi obtenu des cultures de levure qui fabriquent de l'anti-

## L'avènement des ribozymes

trypsine, soit normale, soit mutée; on a pu les purifier et en comparer les propriétés. Toutes deux se montrent capables d'inhiber l'élastase, mais seul le mutant résiste à l'oxydation expérimentale par la N-chlorosuccinimide. On a donc pu fabriquer, par mutagenèse dirigée, une protéine mutée plus stable que la protéine naturelle. Est-il possible d'en prévoir une utilisation thérapeutique?

L'emploi de l' $\alpha_1$  antitrypsine est envisagé dans les déséquilibres élastase-antiélastase : avant tout les déficits en antitrypsine, mais aussi d'autres types d'emphysème en cours d'identification. Les quantités requises sont élevées. Peut-être précisément du fait de son oxydabilité l' $\alpha_1$  antitrypsine a une demi-vie de 4 à 5 jours, très inférieure à celle des principales protéines du plasma. Pour traiter un déficient on estime qu'il faudrait lui fournir environ 4 g d'antitrypsine par semaine (le plasma en contient vingt fois moins que d'albumine). Une stabilisation de la protéine aurait donc un intérêt pratique considérable.

*Nature* a publié en janvier 1985 un article des chercheurs de *Transgène* (Strasbourg). Utilisant une technique analogue, ils ont eux aussi préparé une antitrypsine à valine. De plus, mettant à profit le cas pathologique évoqué plus haut, ils ont remplacé méthionine par arginine et obtenu une activité inhibitrice de la thrombine. Ils espèrent ainsi aboutir à un succès sans précédent : l'exploitation pour la thérapeutique d'une mutation pathologique.

Ces résultats ouvrent des perspectives extrêmement prometteuses, et il est probable que cette « évolution provoquée » sera source de thérapeutiques nombreuses et encore imprévisibles aujourd'hui. J.-C.-D.

Rosenberg S, Barr PJ, Najarian RC, Hallewell RA. Synthesis in yeast of a functional oxidation-resistant mutant of human  $\alpha_1$  antitrypsin. *Nature* 1984; 312 : 77-80.

Owen MC, Brennan SO, Lewis JH, Carrell RW. Mutation of antitrypsin to antithrombin:  $\alpha_1$  Antitrypsin Pittsburgh (358 met  $\rightarrow$  arg), a fatal bleeding disorder. *New Engl J Med* 1984; 309: 694-8.

Courtney M, Tessier L H, Benavente A, Crystal R, Lecocq J P. Synthesis in *E. coli* of  $\alpha_1$ -antitrypsin variants of therapeutic potential for emphysema and thrombosis. *Nature* 1985; 313 : 149-51.

Quelques anciens se souviennent encore d'une controverse qui fit rage au début du siècle dans les milieux scientifiques : les enzymes sont-elles des protéines, ou bien les protéines ne sont-elles que le support inerte de l'activité catalytique? Vers 1930 la question était réglée et le monopole des protéines sur la catalyse en biologie fermement établi. Tout au plus pouvaient-elles accepter parfois un auxiliaire, qualifié de coenzyme ou de groupement prosthétique.

Récemment, un nouveau compétiteur est entré dans l'arène, l'acide ribonucléique. Pour le moment sa candidature reste encore modeste : parmi les trois types principaux d'ARN, comme substrat il ne s'adresse qu'à l'ARN ribosomique et à l'ARN de transfert, pas encore au messager.

Ce sont les investigations de Thomas Cech et de son équipe à Boulder (Colorado) qui ont ouvert cette voie. Travaillant sur le mécanisme d'épissage des introns contenus dans le précurseur de l'ARN ribosomique chez un protozoaire cilié, *Tetrahymena thermophila*, ils ont montré que cet ARN pouvait à lui seul exciser ces introns, en l'absence de tout catalyseur protéique. Une fois excisé, l'intron se cyclisait rapidement, prévenant ainsi toute possibilité de réinsertion du fragment détaché.

Maintenus en veilleuse pendant plus de deux ans, ces résultats sont aujourd'hui largement reconnus. Mais les biochimistes, gens pointilleux, renâclaient à accorder le terme de catalyse à l'action de l'ARN ribosomique : un catalyseur authentique, on l'apprend à l'école, doit se retrouver inchangé et prêt à agir à nouveau au sortir de la réaction. L'ARN ribosomique de Cech est raccourci par son action elle-même et a perdu tout pouvoir catalytique. Or depuis dix ans, Sidney Altman (Yale) se débattait pour faire accepter l'idée d'une activité enzymatique de l'ARN. Il travaillait sur une enzyme dénommée ribonucléase P, dont la spécificité est de scinder les précurseurs des ARN de transfert pour les amener à l'état mature et fonctionnel. La ribonucléase P contient cinq fois plus d'ARN que de protéine, mais s'inactivait lorsqu'on séparait les deux composants. L'affirmation que l'ARN devait être la fraction active se heurtait à l'incrédulité polie des enzymologistes. La solution fut obtenue grâce à l'obstination de l'équipe et à un coup de chance. Comme il est classique en enzymologie on essaya d'augmenter l'activité des préparations en faisant varier les conditions expérimentales. On utilisa ainsi des concentrations variables de magnésium auxquelles on ajouta l'enzyme complète contenant à la fois ARN et protéine. En même temps, on mit en œuvre des « témoins négatifs » contenant seulement, soit l'ARN, soit la protéine, qu'on s'attendait à trouver inactifs. Or les tubes contenant l'ARN seul, mais en présence d'une concentration élevée de magnésium, s'avèrent actifs. A partir de là, les preuves de l'activité enzymatique de l'ARN s'accumulèrent.

Nous l'avons dit, la ribonucléase P d'Altman *et al.* est une enzyme bactérienne. Mais on n'en restera certainement pas là. Dans chaque cellule on a dénombré quantité de petites molécules d'ARN qui attendent qu'on leur assigne une fonction. Il a d'ores et déjà été montré qu'un ARN intervient dans la biosynthèse de l'acide  $\delta$  aminolévulinique chez des végétaux (où il représente le facteur limitant dans la synthèse de la chlorophylle, comme chez les animaux dans celle de l'hème). L'intervention de l'ARN en tant que catalyseur ajouterait une pierre à cet édifice qui donne à ce type de molécule un rôle éminent dans les premières manifestations de la vie. Elle corrobore en tous cas l'extraordinaire flexibilité de l'ARN, capable de se plier à toutes les tâches biologiques plus aisément que l'ADN et les protéines. Les ribozymes ont donc devant elles un avenir prometteur. J.-C. D.

Cech TR et al. *Nature* 1984; 301 : 578-83/Lewin R. *Science* 1984; 223 : 266-7/Altman S, et al. *Science* 1984; 223 : 285-6/Huang DD, et al. *Science* 1984; 225 : 1482-4.