



● **Caractérisation du gène *NPHS2*, codant pour la protéine glomérulaire podocine, impliqué dans une forme familiale de syndrome néphrotique cortico-résistant de transmission autosomique récessive**

**N. Boute, S. Roselli, O. Gribouval, P. Niaudet<sup>1</sup>, M.-Cl. Gubler et C. Antignac**

Inserm U423 et <sup>1</sup>Service de néphrologie pédiatrique, Hôpital Necker-Enfants Malades, Paris

Les syndromes néphrotiques familiaux représentent un modèle d'étude exceptionnel de la physiopathogénie de la barrière de filtration glomérulaire. La forme la mieux caractérisée et la plus sévère est le syndrome néphrotique congénital de type finlandais, dont le gène, *NPHS1*, localisé sur le chromosome 19, code pour la néphrine, protéine transmembranaire exprimée au niveau du diaphragme de fente, qui relie les pieds des podocytes sur la membrane basale glomérulaire.<sup>1,2</sup> A l'inverse, des formes familiales moins sévères, de transmission autosomique dominante ou récessive, souvent dénommées « hyalinose segmentaire et focale primitive – primary (idiopathic) focal segmental glomerulosclerosis », ont été décrites. Elles se caractérisent par une protéinurie, l'apparition progressive d'un syndrome néphrotique puis d'une insuffisance rénale terminale. Deux gènes, dans des formes autosomiques dominantes, ont été localisés: l'un en 11q21-22,<sup>3</sup> l'autre en 19q13, qui vient d'être identifié récemment comme étant le gène *ACTN4*, codant pour l' $\alpha$ -actinine 4, protéine se liant aux filaments d'actine.<sup>4</sup>

En 1995, une entité particulière de syndrome néphrotique cortico-résistant de transmission autosomique récessive a été caractérisée dans le laboratoire sur les critères suivants: début précoce avant trois ans, évolution constante vers l'insuffisance rénale terminale, absence de récidence après transplantation rénale et lésions de hyalinose segmentaire et focale sur les biopsies rénales. Par des études de liaison dans neuf familles, le gène responsable (nommé initialement *SRN1* et appelé maintenant *NPHS2*) a été localisé sur le bras long du chromosome 1 en 1q25-q31, entre les marqueurs D1S452 et D1S46.<sup>5</sup> Cette localisation a été confirmée par un autre groupe, et plus récemment, une liaison à cette région a également été démontrée dans une famille présentant une hyalinose segmentaire et focale débutant à l'âge adulte.<sup>6</sup> Toutefois, dans une famille, la liaison au locus *NPHS2* était clairement exclue, prouvant l'existence d'une hétérogénéité génétique.

Par de multiples approches de cartographie génétique, nous avons alors complètement caractérisé la région génomique où se situait le gène en cause et identifié différents gènes localisés dans l'intervalle critique.<sup>7</sup> L'un d'entre eux, entièrement nouveau, s'est avéré particulièrement intéressant car l'étude en northern blot a montré qu'il était exprimé exclusivement dans le rein. Nous avons ensuite confirmé ces résultats en hybridant un dot blot contenant des ARN de cinquante tissus différents. Un fort signal a été obtenu seulement avec le rein adulte et le rein fœtal.

Nous avons donc caractérisé la structure exon-intron de ce gène et recherché des mutations, au sein de ses huit exons, chez seize patients non apparentés. Nous avons pu identifier dix mutations différentes dans quatorze familles comprenant des substitutions, des décalages du cadre de lecture et des apparitions de codons stop prématurés. Ces différentes mutations désignent clairement ce gène comme responsable de ce syndrome néphrotique. Il est à noter qu'une des mutations, conduisant à la substitution de l'arginine 138 par une glutamine (R138Q), a été retrouvée chez six des quatorze patients testés. L'origine géographique commune des enfants porteurs de cette mutation (Allemagne, Belgique, Pays-Bas et Est de la France) suggère un effet fondateur.

Les expériences d'hybridation *in situ* ont permis de montrer que le gène *NPHS2* est exprimé uniquement au niveau des podocytes dans le rein mature. Dans les reins fœtaux, aucun signal n'a été observé aux stades précoces de développement du néphron. En revanche, des signaux intenses ont été détectés dans le segment inférieur du corps en S, dans la région correspondant aux futurs podocytes. Cette expression persiste dans les glomérules immatures et dans les glomérules matures du cortex profond. Ce patron d'expression est tout à fait comparable à celui de la néphrine.<sup>8</sup>

En raison de son expression pratiquement exclusive au niveau des podocytes, nous avons appelé podocine la protéine de 383 acides aminés codée par le gène *NPHS2*. Les programmes de prédiction de structure indiquent que la podocine est constituée d'un domaine amino-terminal de 104 acides aminés, d'un court domaine trans-membranaire de 17 acides aminés et d'un long domaine carboxy-terminal cytoplasmique de 262 acides aminés. Elle appartient à la famille protéique des stomatines (ou band-7) et présente de fortes homologues avec la stomatine humaine et la protéine MEC-2 de *Caenorhabditis elegans*. Ces homologues suggèrent que, comme ces deux protéines, la podocine possède une structure en épingle à cheveux avec des domaines amino- et carboxy-terminaux cytoplasmiques.

La protéine MEC-2 est présente dans les neurones mécanosensoriels et jouerait un rôle dans la réponse au toucher de ces cellules, en liant le cytosquelette aux canaux ioniques.<sup>9</sup> La stomatine, appelée aussi band-7, a été initialement observée à la membrane des globules rouges où son rôle demeure mal connu.<sup>10</sup> Cependant, plus récemment, la présence de stomatine a été observée dans les neurones sensoriels de mammifères, impliquant probablement pour la stomatine un rôle équivalent à celui de MEC-2 dans ces cellules.<sup>11</sup> Ainsi, les homologies de séquence de la podocine avec les stomatines et les homologies de structure avec les cavéolines (protéines qui, par leur oligomérisation, servent de charpente aux cavéoles) suggèrent que la podocine pourrait jouer un rôle dans la liaison des protéines membranaires du podocyte avec le cytosquelette. Elle pourrait interagir avec des protéines localisées au niveau du diaphragme de fente comme la néphrine, ZO-1 ou CD2AP.<sup>12</sup>

En conclusion, nous venons d'identifier un nouveau gène, *NPHS2*, s'exprimant de façon quasi-exclusive dans les podocytes et codant pour une protéine membranaire, la podocine. Cette protéine joue un rôle majeur dans la filtration glomérulaire puisque son absence ou son altération entraînent la survenue d'un syndrome néphrotique. La découverte de ce gène va permettre de proposer un diagnostic précis pour certains des patients présentant un syndrome néphrotique cortico-résistant. Par ailleurs, il est également possible que des altérations du gène *NPHS2* soient retrouvées dans d'autres formes de hyalinose segmentaire familiales ou non ainsi que dans des formes secondaires (Sida, réduction néphronique, etc.), où les mutations de *NPHS2* pourraient être non pas causales mais prédisposer au développement des lésions. De façon plus générale, il est certain que la découverte du rôle de gènes à expression principalement podocytaire dans le développement de syndromes néphrotiques, ouvre la voie à une modification radicale de la compréhension de la physiopathologie du podocyte et de la barrière de filtration glomérulaire.

#### Adresses de correspondance :

Dr Nicolas Boute  
Institut Cochin de génétique moléculaire  
CNRS UPR 415  
22, rue Méchain  
F-75014 Paris



## Références

1. Kestila M, Lenkkeri U, Mannikko M, Lamerdin J, McCready P, Putaala H, et al. Positionally cloned gene for a novel glomerular protein-nephrin-is mutated in congenital nephrotic syndrome. *Mol Cell* 1998; 1: 575-82.
2. Ruotsalainen V, Ljungberg P, Wartiovaara J, Lenkkeri U, Kestila M, Jalanko H, et al. Nephrin is specifically located at the slit diaphragm of glomerular podocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 7962-7.
3. Winn MP, Conlon PJ, Lynn KL, Howell DN, Slotterbeck BD, Smith AH, et al. Linkage of a gene causing familial focal segmental glomerulosclerosis to chromosome 11 and further evidence of genetic heterogeneity. *Genomics* 1999; 58: 113-20.
4. Kaplan JM, Kim SH, North KN, Renke H, Correia LA, Tong HQ, et al. Mutations in *ACTN4*, encoding alpha-actinin-4, cause familial focal segmental glomerulosclerosis. *Nat Genet* 2000; 24: 251-6.
5. Fuchshuber A, Jean G, Gribouval O, Gubler MC, Broyer M, Beckmann JS, et al. Mapping a gene (*SRN1*) to chromosome 1q25-q31 in idiopathic nephrotic syndrome confirms a distinct entity of autosomal recessive nephrosis. *Hum Mol Genet* 1995; 4: 2155-8.
6. Moeller MJ, Kovari IA, Holzman LB. Evaluation of a new tool for exploring podocyte biology: Mouse *Nphs1* 5' flanking region drives LacZ expression in podocytes. *J Am Soc Nephrol* 2000; 11: 2306-14.
7. Boute N, Gribouval O, Roselli S, Benesy F, Lee H, Fuchshuber A, et al. *NPHS2*, encoding the glomerular protein podocin, is mutated in autosomal recessive steroid-resistant nephrotic syndrome. *Nat Genet* 2000; 24: 349-54.
8. Tsukaguchi H, Yager H, Dawborn J, Jost L, Cohlmiä J, Abreu PF, et al. A locus for adolescent and adult onset familial focal segmental glomerulosclerosis on chromosome 1q25-31. *J Am Soc Nephrol* 2000; 11: 1674-80.
9. Huang M, Gu G, Ferguson EL, Chalfie M. A stomatin-like protein necessary for mechanosensation in *C. elegans*. *Nature* 1995; 378: 292-5.
10. Stewart GW, Hepworth-Jones BE, Keen JN, Dash BC, Argent AC, Casimir CM. Isolation of cDNA coding for an ubiquitous membrane protein deficient in high Na<sup>+</sup>, low K<sup>+</sup> stomatocytic erythrocytes. *Blood* 1992; 79: 1593-601.
11. Mansfeldt AG, Carroll P, Stucky CL, Lewin GR. Stomatin, a MEC-2 like protein, is expressed by mammalian sensory neurons. *Mol Cell Neurosci* 1999; 13: 391-404.
12. Reiser J, Kriz W, Kretzler M, Mundel P. The glomerular slit diaphragm is a modified adherens junction. *J Am Soc Nephrol* 2000; 11: 1-8.



## ● Fibrose interstitielle rénale et carcinomes urothéliaux après ingestion d'une herbe chinoise (*Aristolochia Fangchi*)

J. Nortier

Département de néphrologie, dialyse et transplantation, CUB Hôpital Erasme, Bruxelles

La néphropathie dite aux herbes chinoises (CHN pour Chinese-herb nephropathy) est une fibrose interstitielle rénale initialement rapportée chez des femmes au décours de l'ingestion de gélules à visée amaigrissante contenant des plantes chinoises.<sup>1</sup> Les racines de l'une d'elles, *Stephania Tetrandra* (*Han fangji* en pin yin), ont été substituées par des extraits d'*Aristolochia fangchi* (*Guang fangji* en pin yin), comme l'atteste la détection d'acides aristolochiques en lieu et place de tétrandrine (alcaloïde de *Stephania*) à l'issue des analyses phytochimiques effectuées.<sup>2</sup>

A ce jour, environ cent quinze patientes (toutes des femmes à l'exception de deux hommes) sont suivies dans le Département de néphrologie de l'Hôpital Erasme (Université Libre de Bruxelles). Une cinquantaine d'entre elles a atteint le stade terminal de l'insuffisance rénale et sont porteuses, pour la grande majorité, d'un greffon rénal fonctionnel. Une trentaine présentent une insuffisance rénale chronique modérée à sévère tandis que les autres cas ont encore des paramètres fonctionnels rénaux peu altérés (créatinine sérique inférieure ou égale à 1,2 mg/dl).

Les études histologiques ont montré que la fibrose interstitielle était initialement observée dans le cortex superficiel des reins – essentiellement composé de tubules proximaux – et progressait ensuite vers le cortex profond selon un gradient cortico-médullaire.<sup>3</sup> Ce processus destructeur conduit à une atrophie sévère de la population tubulaire proximale en laissant intacts les glomérules – du moins au stade précoce de la maladie.

Afin d'apprécier la sévérité de l'atteinte tubulo-interstitielle à différents stades d'insuffisance rénale, l'excrétion urinaire d'endopeptidase neutre (NEP), une ecto-enzyme de la bordure en brosse du tubule proximal, a été mesurée dans les urines obtenues de patientes présentant différents degrés de sévérité d'atteinte interstitielle chronique. En parallèle, l'excrétion urinaire de microprotéines a été mesurée afin d'apprécier le défaut de réabsorption apicale de l'épithélium tubulaire. De façon significative, l'enzymurie NEP a progressivement diminué jusqu'à être quasiment abolie au fur et à mesure que l'insuffisance rénale progressait. Une image en miroir a été obtenue pour l'excrétion urinaire

des microprotéines, témoignant d'une dysfonction sévère de la capacité de réabsorption du tubule proximal. Par ailleurs, l'enzymurie NEP était positivement corrélée avec les valeurs individuelles de clearance de créatinine ( $r = 0,75$ ;  $p = 0,0001$ ), illustrant la relation structure/fonction évoquée dans la progression de la plupart des néphropathies.<sup>4</sup>

Les acides aristolochiques (AA), principaux composants de l'Aristolochie, sont des dérivés nitrophénanthrènes connus pour leur potentiel carcinogène chez les rongeurs ainsi que leurs propriétés mutagènes in vitro (références toutes reprises en<sup>5</sup>).

Nous avons dès 1998 proposé l'ablation à titre prophylactique des reins et uretères propres à nos quarante-trois patient(e)s en urémie terminale sur CHN (dialysé(e)s ou transplanté(e)s).<sup>5</sup> Les pièces opératoires ont été examinées histologiquement et la présence d'adduits d'ADN formés par les AA a été recherchée. Sur base du recensement de toutes les prescriptions exécutées durant la période d'exposition aux herbes chinoises en Belgique (1990-1992), la dose totale cumulée individuelle de chaque composant des gélules (soi-disant *Stephania* – en réalité *Aristolochia fangchi* – anorexigènes et acétazolamide) a été déterminée. Parmi les trente-neuf patients (F/M: 38/1) ayant accepté la chirurgie, dix-huit cas de carcinome urothélial ont été détectés (prévalence 46%; intervalle de confiance à 95%: 29-62%) au niveau des bassinets et/ou des uretères, hormis une tumeur papillaire vésicale. Dix-neuf cas sur les vingt et un restants présentaient des lésions de dysplasie légère à modérée au niveau de l'urothélium des voies excrétrices hautes.

Tous les échantillons tissulaires analysés (38 cas/39) étaient positifs pour les adduits d'ADN formés par les AA. Par contre, la recherche d'adduits à l'ochratoxine A s'est révélée négative, à l'exception d'un résultat à la limite de la détection dans quatre des vingt-cinq cas étudiés. En l'occurrence, bien que des analogies existent entre CHN et néphropathie des Balkans au niveau de la présentation clinique et des caractéristiques histologiques, on ne peut incriminer l'ochratoxine A dans la pathogénie de la CHN.

L'influence éventuelle de la mésothérapie administrée (injections intradermiques d'extraits d'artichaut et/ou d'euphylline), de l'utilisation conjointe d'anti-inflammatoires non stéroïdiens et du status tabagique a été évaluée en utilisant une analyse univariée. Aucune différence statistiquement significative n'a été trouvée concernant ces variables entre les patients atteints de carcinome urothélial et ceux non atteints. Au niveau de l'analyse des différents constituants des gélules, seule la dose cumulée du soi-disant *Stephania* a représenté un facteur de risque significatif pour le cancer urothélial (dose totale supérieure à 200 g associée à un risque statistiquement accru).

Les effets carcinogènes et mutagènes des AA sont mis en relation avec la formation de liens covalents entre les bases puriques de l'ADN et certains métabolites de ces AA (aristolactames), donnant naissance aux adduits spécifiques précédemment cités. Cette propriété justifie le classement des AA parmi les carcinogènes génotoxiques. En effet, l'adduit principal [7-(déoxyadénosine- $N^6$ -yl-aristolactam I-ADN)] est une lésion pré-mutagène associée à des gènes biologiquement importants impliqués dans la carcinogenèse comme le *H-ras* proto-oncogène et le gène *p53*.

En résumé, nos données suggèrent que les toxines d'*Aristolochia fangchi* (AA et peut-être aussi d'autres dérivés) peuvent induire une fibrose rénale et un carcinome urothélial. D'autres cas typiques de CHN ont été rapportés en France, au Royaume-Uni et à Taïwan, pays dans lesquels plusieurs cas de carcinome urothélial ont été détectés. Ces observations devraient inciter les néphrologues et urologues à approfondir l'anamnèse portant sur l'utilisation de plantes médicinales chez des patient(e)s présentant une insuffisance rénale et/ou une tumeur urothéliale d'origine indéterminée. D'une façon plus générale, nos observations attestent le fait que les médecines dites naturelles ne sont pas dénuées de risque et que les extraits de plantes médicinales doivent être soumis à une réglementation aussi rigoureuse que le sont les médicaments.

#### Adresses de correspondance :

Dr J. Nortier  
CUB Hôpital Erasme  
Département de néphrologie, dialyse et transplantation  
Route de Lennik 808  
B-1070 Bruxelles  
E-mail : jnortier@ulb.ac.be



## Références

1. Vanherweghem JL, Depierreux M, Tielemans C, Abramowicz D, Dratwa M, Jadoul M, Richard C, Vandervelde D, Verbeelen D, Vanhaelen-Fastre R, Vanhaelen M. Rapidly progressive interstitial renal fibrosis in young women: Association with slimming regimen including Chinese herbs. *Lancet* 1993; 341 : 387-91.
2. Vanhaelen M, Vanhaelen-Fastre R, But P, Vanherweghem JL. Identification of aristolochic acid in Chinese herbs. *Lancet* 1994; 343 : 174.
3. Depierreux M, Van Damme B, Vanden Houte K, Vanherweghem JL. Pathologic aspects of a newly described nephropathy related to the prolonged use of Chinese herbs. *Am J Kidney Dis* 1994; 24 : 172-80.
4. Nortier JL, Deschodt-Lanckman MM, Simon S, Thielemans NO, De Prez EG, Depierreux MF, Tielemans CL, Richard C, Lauwerys RR, Bernard AM, Vanherweghem JL. Proximal tubular injury in Chinese herbs nephropathy: Monitoring by neutral endopeptidase enzymuria. *Kidney Int* 1997; 51 : 288-93.
5. Nortier JL, Muniz Martinez MC, Schmeiser HH, Arlt VM, Bieler CA, Petein M, Depierreux MF, De Pauw L, Abramowicz D, Vereerstraeten P, Vanherweghem JL. Urothelial carcinoma associated with the use of a Chinese herb (*Aristolochia Fangchi*). *N Engl J Med* 2000; 342 : 1686-92.



● **30 ans: happy birthday RCPG**  
**Le récepteur B2 de la bradykinine: voie alternative et antiproliférative**

**J. Duchêne, J. Schanstra, E. Cellier, J.-L. Bascands et J.-P. Girolami**

INSERM U 388 Pharmacologie moléculaire et physiopathologie rénale, IFR 31, CHU Rangueil, Toulouse

## Résumé • Summary

Le récepteur B2 de la bradykinine qui appartient à la superfamille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) est essentiellement connu pour ses effets prolifératifs. Les voies de signalisation mitogénique utilisées sont des voies dites « classiques » pour un RCPG. De récents travaux réalisés au sein de notre équipe nous permettent de discuter de l'action anti-proliférative de la bradykinine observée dans des conditions proliférantes, mais également de la voie « alternative » utilisée à cet effet qui fait intervenir une protéine tyrosine phosphatase. Au-delà du récepteur B2, c'est une nouvelle conception de la signalisation des RCPG qui est mis en avant, montrant ainsi la complexité de ces récepteurs.

**Mots clés:** RCPG – PTPase – Antiprolifération.

The bradykinin B2 receptor which belongs to G protein coupled receptor (GPCR) family is known for its proliferative effects. The mitogenic signalling pathways used are « classical » pathways for GPCRs. Recent data from our laboratory show that bradykinin can also induce anti-mitogenic effects in proliferating cells using an « alternative » signal transduction pathway involving a protein tyrosine phosphatase. Besides this alternative signalling pathway for the B2 receptor, a novel concept of GPCR signalling is described.

**Key words:** GPCR – PTPase – Antiprolifération.

## Abréviations

MAPK : Mitogen-Activated Proteine Kinase  
PI3K : phosphoinositide 3-kinase  
PKC : protéine kinase C  
PLC : phospholipase C  
PTPase : protéine tyrosine phosphatase  
RCPG : récepteur couplés aux protéines G  
RTK : récepteur à activité tyrosine kinase

Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) forment la plus grande famille de protéines présente chez les eucaryotes. Ces récepteurs ont fait l'objet de nombreuses recherches, notamment entre 1971 et 1993 où l'ensemble des travaux réalisés a contribué au développement d'un modèle général de signalisation des RCPGs (association-dissociation des protéines G, activation de l'adénylate cyclase, de la phospholipase C, etc.). Depuis ces deux décennies, de nombreuses données ont « révolutionné » ces acquis dont la notion d'homo- ou hétéro-dimérisation des RCPG qui a bouleversé le concept d'un récepteur couplé à une protéine G. Puis, la découverte des RCPG utilisant la voie MAPK (mitogen-activated proteine kinases) via l'activation de protéine kinase C (PKC) (1993) est venue compléter les observations concernant l'effet mitogénique des RCPG, et plus récemment il a été montré que cette activation de la voie MAPK pouvait passer par la transactivation des récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK) (1996). Enfin, les données les plus récentes portent sur le principe même de définition des RCPG, c'est-à-dire le couplage des protéines G aux récepteurs (datant de 1971); en effet, plusieurs études ont remis ce dogme en question en proposant l'existence des voies de signalisation alternatives et indépendantes des protéines G.

Nous discuterons ici d'un RCPG en particulier, le récepteur B2 de la bradykinine, et des données concernant notamment l'existence d'interaction directe indépendante de protéines G et des effets mitogénique et anti-mitogénique médiés par ce récepteur au niveau des cellules mésangiales.

## Bradykinine

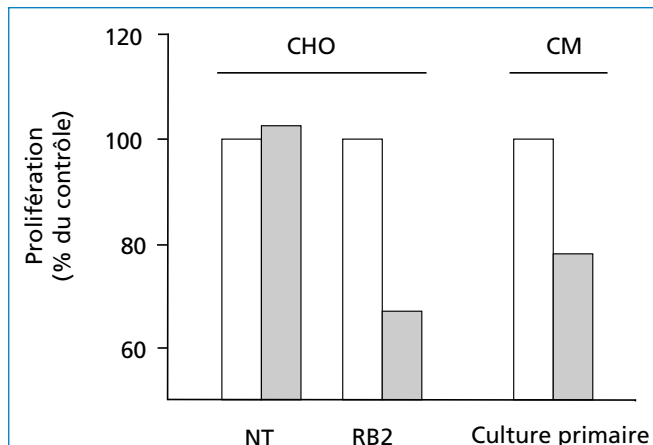
La bradykinine est un non-peptide de la famille des kinines. Elle est générée au niveau du plasma, du pancréas, du rein, des intestins, du cerveau et des glandes sudoripares par les kallikréines plasmatiques et tissulaires qui hydrolysent les substrats kininogènes en kinines actives. La bradykinine peut agir de manière paracrine et autocrine. Elle est surtout connue pour ses effets vasodilatateurs sur le système cardiovasculaire via la production de monoxyde d'azote, mais également pour son action diurétique et natriurétique au niveau rénal.<sup>1</sup>

## Récepteur B2 de la bradykinine et prolifération

La bradykinine exerce son activité pharmacologique en stimulant le récepteur B2 de la bradykinine présent dans de nombreux tissus. Comme beaucoup de récepteurs couplés aux protéines G, le récepteur B2 est impliqué dans la prolifération cellulaire, et son

activation stimule des voies de signalisations dites « classiques » pour un RCPG. En effet, le couplage du récepteur aux protéines Gq et/ou Gi active la phospholipase C (PLC) et/ou la phosphoinositide 3-kinase (PI3K) qui conduisent à l'activation successive de diverses protéines comme la PKC, et les MAPK. Ainsi, il a été montré que la stimulation du récepteur B2 induit la prolifération de nombreux types cellulaires (cellules mésangiales, cellules fibroblastiques de poumon, cellules de carcinome du côlon, etc.) en absence de sérum.<sup>2,3,4</sup>

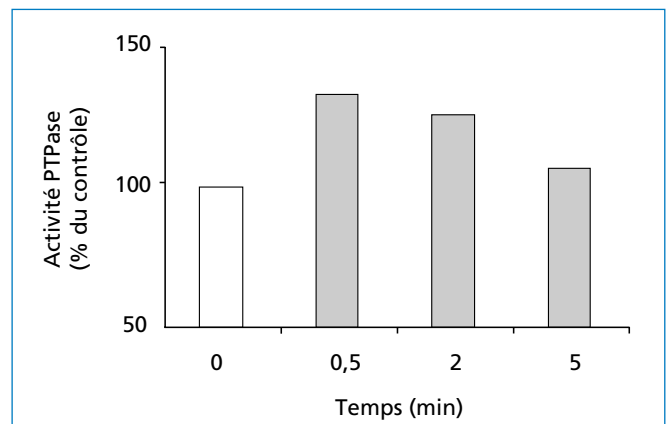
Récemment notre équipe a démontré que la bradykinine peut exercer une action anti-proliférative sur les cellules mésangiales, mais également sur des cellules CHO surexprimant le récepteur B2 de la bradykinine, lorsque celles-ci sont stimulées par du sérum ou un facteur de croissance tel que l'IGF-1 (fig. 1). Cet effet a par ailleurs été observé au niveau des cellules musculaires lisses d'artère et des cellules stromales de sein par d'autres équipes.<sup>5,6</sup>



**Fig. 1 :** Effet inhibiteur de la bradykinine sur la prolifération cellulaire. Les clones CHO NT, RB2 et les cellules mésangiales cultivées 48 heures en présence de sérum (10% SVF) ont été traitées (barres tramées) ou non (barres vides) par la bradykinine (100 nM). On note une inhibition d'environ 35% de la prolifération lorsque les cellules sont stimulées par la bradykinine. NT : non transfecté; RB2 : surexpression du récepteur B2 de la bradykinine.

### Récepteur B2 de la bradykinine et signalisation

La signalisation pro-mitogénique émanant du récepteur B2 a été bien approfondie, par contre la signalisation anti-mitogénique reste très peu étudiée. Il apparaît tout de même que l'activation du récepteur soit associée à une diminution de l'activité tyrosine-kinase, et ceci de manière indépendante des protéines G et des voies « classiques » comme précédemment décrites. En effet, les traitements à la pertussis toxine, aux inhibiteurs de la PLC et de la PKC, et aux chélateurs de calcium restent inefficaces au niveau de l'inhibition de l'activité tyrosine kinase induite par la bradykinine.<sup>7,8</sup> Ceci laisse donc supposer qu'il existe une voie alternative anti-proliférative indépendante des voies habituellement décrites chez les RCPGs. Dans des expériences parallèles, l'effet anti-prolifératif s'accompagne également : 1) d'une augmentation de l'activité tyrosine phosphatase (fig. 2)<sup>7</sup>; 2) d'une diminution de la phosphorylation totale des protéines<sup>8</sup> et 3) d'une diminution de la phosphorylation des protéines impliquées dans la transduction de signal prolifératif (telles que les récepteurs EGF et les MAPKs),<sup>9</sup> ce qui suggère un rôle important d'une protéine tyrosine phosphatase (PTPase) dans cette voie alternative.



**Fig. 2 :** Activité PTPase au cours du temps. La stimulation des cellules mésangiales par la bradykinine entraîne une augmentation transitoire de l'activité PTPase.

### Récepteur B2 de la bradykinine et interaction directe

Une possible explication quant à l'implication d'une PTPase dans la signalisation du récepteur B2 indépendamment des protéines G serait le recrutement direct de cette PTPase au niveau du récepteur lui-même. Cette idée émane de différentes données démontrant l'interaction directe entre des RCPG et diverses protéines. Parmi ces voies non classiques, la phosphorylation de la tyrosine 319 située sur la partie C-terminale du récepteur AT1 de l'angiotensine permet le recrutement d'effecteur tel que la PLCγ (via son domaine SH2) ou JAK2 (janus kinase) et leur activation.<sup>10,11</sup> La séquence YIPP (tyrosine-isoleucine-proline-proline) localisée à l'interface cytosolique du septième domaine transmembranaire du récepteur semble dans ce cas jouer un rôle important. L'activation de JAK2 a également été observée suite à son recrutement direct au niveau du récepteur CCR2B des chemokines.<sup>12</sup> Enfin, le dernier exemple que nous citerons concerne le récepteur B2 de la bradykinine ; l'enzyme NO synthase endothéliale est liée à l'état basal à la dernière boucle intracellulaire du récepteur B2. La fixation de la bradykinine sur son récepteur entraîne la dissociation du complexe et l'activation de la NO synthase.<sup>13</sup> L'ensemble de ces exemples montre bien une nouvelle possibilité d'activation des voies de signalisation indépendamment des protéines G : l'interaction directe RCPG-effecteur. Il est alors permis de supposer qu'il existe une interaction directe entre le récepteur B2 et une PTPase qui induirait son activation et entraînerait l'inhibition des voies prolifératives RTK.

### Récepteur B2 de la bradykinine : deux actions et deux voies indépendantes

Le récepteur B2 de la bradykinine a souvent été décrit comme un RCPG mitogénique. En effet, de nombreuses publications tendent à montrer que la stimulation par la bradykinine active des voies de signalisations pro-mitogéniques dites « classiques » pour un RCPG.

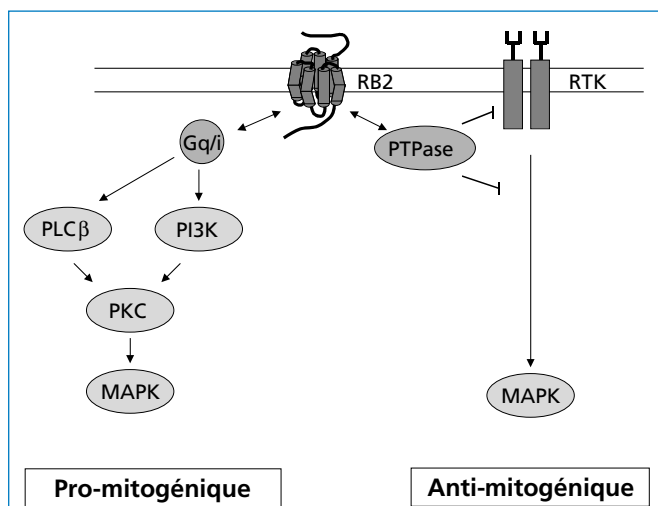
Notre équipe a démontré que le récepteur B2 pouvait avoir un pouvoir anti-mitogénique sur les cellules mésangiales en présence de sérum, et ceci par un mécanisme « non classique » qui fait intervenir une tyrosine-phosphatase. Bien que le mécanisme d'action exact ne soit pas encore complètement élucidé, en s'appuyant sur des expériences récentes, on peut imaginer que suite à une stimulation par la bradykinine, l'activation d'une PTPase se fasse par



un recrutement direct au niveau du récepteur B2. Une fois active, cette enzyme peut alors déphosphoryler les voies de signalisations RTK (soit au niveau du récepteur lui-même, soit au niveau des protéines impliquées dans les voies de transduction de signal), ce qui a pour conséquences d'inhiber la prolifération.

Ainsi, selon le type cellulaire et les conditions de culture (en particulier l'activation des RTKs par des facteurs de croissance), les voies de signalisation activées par la bradykinine sont différentes, indépendantes et ont une finalité antagoniste (fig. 3).

Trente ans après la découverte par Rodbell (qui en 1994 partagea le Prix Nobel avec Gilman) des protéines G en tant que transducteur de signal de récepteur, l'histoire des RCPG n'a cessé d'évoluer en passant par la compréhension du mécanisme d'association-dissociation des protéines G hétérotrimériques, la caractérisation de la voie de signalisation mitogénique, l'existence d'interactions directes entre le récepteur et diverses protéines, et enfin plus récemment le recrutement direct d'une tyrosine phosphatase au niveau d'un RCPG pouvant induire un effet anti-mitogénique.



**Fig. 3 :** Deux voies antagonistes et indépendantes.

La voie *pro-mitogénique* classique ou suite à la stimulation du récepteur B2, le recrutement d'une protéine G (Gq/Gi) active la PLC et/ou la PI3K qui à leur tour activent la PKC et enfin les MAPKs. La voie *anti-mitogénique* passe par le recrutement direct d'une PTPase au niveau du récepteur B2 induisant l'activité tyrosine-phosphatase, ce qui permet de réduire l'activation des voies RTKs pro-mitogéniques.

**Adresses de correspondance :**

Adresse de correspondance :  
Dr Jean-Pierre Girolami  
INSERM U 388, IFR 31  
CHU Rangueil  
F-31403 Toulouse Cedex 4  
E-mail : jean-pierre.girolami@toulouse.inserm.fr

1. Bascands JL, Girolami JP. La bradykinine. Médecine/Sciences 1996; 12: 582-92.
2. Bascands JL, Pecher C, Rouaud S, Emond C, Tack JL, Bastie MJ, Burch R, Regoli D, Girolami JP. Evidence for existence of two distinct bradykinin receptors on rat mesangial cells. Am J Physiol 1993; 264: F548-56.
3. Graness A, Adomeit A, Heinze R, Wetzker R, Liebmann C. A novel mitogenic signaling pathway of bradykinin in the human colon carcinoma cell line SW-480 involves sequential activation of a Gq/11 protein, phosphatidylinositol 3-kinase beta, and protein kinase Cepsilon. J Biol Chem 1998; 273: 32016-22.
4. Goldstein RH, Wall M. Activation of protein formation and cell division by bradykinin and des-Arg9-bradykinin. J Biol Chem 1984; 259: 9263-8.
5. Dixon BS, Dennis MJ. Regulation of mitogenesis by kinins in arterial smooth muscle cells. Am J Physiol 1997; 273: C7-20.
6. Patel KV, Schrey MP. Inhibition of DNA synthesis and growth in human breast stromal cells by bradykinin: Evidence for independent roles of B1 and B2 receptors in the respective control of cell growth and phospholipid hydrolysis. Cancer Res 1992; 52: 334-40.
7. Alric C, Pecher C, Schanstra JP, Bascands JL, Girolami JP. Bradykinin-induced inhibition of cell proliferation and tyrosine kinase activity in rat mesangial cells. Int J Mol Med 2000; 5: 85-93.
8. Alric C, Pecher C, Bascands JL, Girolami JP. Effect of bradykinin on tyrosine kinase and phosphatase activities and cell proliferation in mesangial cells. Immunopharmacology 1999; 45: 57-62.
9. Graness A, Hanke S, Boehmer FD, Presek P, Liebmann C. Protein-tyrosine-phosphatase-mediated epidermal growth factor (EGF) receptor trans-inactivation and EGF receptor-independent stimulation of mitogen-activated protein kinase by bradykinin in A431 cells. Biochem J 2000; 347: 441-7.
10. Venema RC, Ju H, Venema VJ, Schieffer B, Harp JB, Ling BN, Eaton DC, Marrero MB. Angiotensin II-induced association of phospholipase Cgamma1 with the G-protein-coupled AT1 receptor. J Biol Chem 1998; 273: 7703-8.
11. Ali MS, Sayeski PP, Dirksen LB, Hayzer DJ, Marrero MB, Bernstein KE. Dependence on the motif YIPP for the physical association of Jak2 kinase with the intracellular carboxyl tail of the angiotensin II AT1 receptor. J Biol Chem 1997; 272: 23382-8.
12. Mellado M, Rodriguez-Frade JM, Aragay A, del Real G, Martin AM, Vila-Coro AJ, Serrano A, Mayor F Jr, Martinez AC. The chemokine monocyte chemoattractant protein 1 triggers Janus kinase 2 activation and tyrosine phosphorylation of the CCR2B receptor. J Immunol 1998; 161: 805-13.
13. Ju H, Venema VJ, Marrero MB, Venema RC. Inhibitory interactions of the bradykinin B2 receptor with endothelial nitric-oxide synthase. J Biol Chem 1998; 273: 24025-9.