

Médecine expérimentale

M. Pierre CORVOL, membre de l'Institut
(Académie des Sciences), professeur

RAPPORT D'ACTIVITÉ DU LABORATOIRE

I — CONTRÔLE MOLÉCULAIRE DU DÉVELOPPEMENT VASCULAIRE

Équipe : A. EICHMANN, L. PARDANAUD, L. YUAN, F. LE NOBLE, C. FREITAS, X. LU,
S. SUTCHING, B. DE LAFARGE, C. BREANT

I-1. Rôle des forces hémodynamiques dans l'établissement de l'identité artériovoineuse des cellules endothéliales

Nos travaux récents ont montré que malgré l'expression sélective de certains gènes dans l'endothélium artériel ou veineux, il existe une plasticité considérable des cellules endothéliales (CE) au cours du développement normal chez l'embryon de poulet (Le Noble F. *et al.*, 2004). En effet, la manipulation expérimentale du flux sanguin permet de modifier l'expression de ces marqueurs : la ligature d'une artère vitelline provoque l'arrêt du flux sanguin du côté distal de la ligature, cette manipulation conduit à la disparition de l'expression des marqueurs artériels et à la transformation des artères en veines au cours d'une période de huit heures seulement. Si la ligature est enlevée, le sang peut reperfusionner l'artère, les marqueurs artériels sont réexprimés. Cette manipulation simple du flux sanguin permet donc la transformation d'une artère en une veine, aussi bien morphologiquement (la direction du flux sanguin change) que génétiquement (l'expression des marqueurs spécifique des artères et des veines changent).

I-2. Relation système vasculaire-système nerveux

Les systèmes vasculaire et nerveux sont des systèmes complexes, ramifiés et anatomiquement similaires. Le guidage des vaisseaux et des nerfs doit être minutieusement régulé afin d'assurer le fonctionnement approprié des deux

réseaux. Plusieurs régulateurs du guidage axonal ont été identifiés et certains s'expriment également dans les vaisseaux sanguins. Nous avons montré qu'un des récepteurs du facteur de guidage axonal nétrine-1, UNC5B, s'exprime dans les cellules spécialisées situées à l'extrémité des capillaires qui sont morphologiquement similaires aux cônes de croissance des axones. La perte de fonction d'*Unc5b* chez l'embryon de souris ou le poisson-zèbre provoque l'extension accrue de filopodes des cônes de croissance endothéliaux et un branchement excessif du réseau vasculaire. Le traitement de cellules endothéliales avec le ligand nétrine-1 provoque la rétraction des filopodes. Cet effet est perdu dans les mutants *Unc5b*. UNC5B fonctionne donc comme un récepteur de guidage répulsif contrôlant la morphogenèse du système vasculaire (Lu X. *et al.*, 2004, Eichmann A. *et al.*, 2005 a, b).

I-3. Participation des précurseurs endothéliaux embryonnaires circulants à la vascularisation tumorale

Des études récentes montrent que des précurseurs endothéliaux sont présents dans le sang adulte. *In vitro* ces cellules se différencient en CE ; *in vivo* ces précurseurs peuvent être incorporés dans des sites de néovascularisation. Sur le plan thérapeutique, ces cellules circulantes pourraient être utilisées pour acheminer des molécules anti- ou pro-angiogéniques à des sites d'angiogenèse physiologique ou pathologique. Chez l'embryon, nous avons réalisé des parabioses caille-poulet et montré, en utilisant un marqueur spécifique des CE de caille, que ces cellules circulent et sont retrouvées dans de nombreux territoires embryonnaires mais toujours en faible nombre. Cependant, ces cellules sont mobilisables lors d'une angiogenèse expérimentale, la greffe d'un bourgeon de membre ou une blessure, par exemple, et participent alors en grand nombre au processus de néovascularisation requis (Pardanaud L. & Eichmann A., soumis).

Nous étudierons désormais la participation de ces cellules à l'angiogenèse tumorale. En collaboration avec l'Inserm E0113, nous avons mis au point un système expérimental de développement tumoral chez l'embryon de poulet. La greffe de cellules de glioblastome humain (lignée U87) sur la membrane chorio-allantoïdienne (CAM) provoque la formation de tumeurs hautement vascularisées et partiellement nécrosées pendant une période de sept jours seulement. Chez l'homme, l'invasion d'un gliome par des vaisseaux sanguins (« angiogenic switch ») induit la progression rapide de la croissance tumorale et est corrélée avec un pronostic clinique très défavorable pour le patient. Cet « angiogenic switch » a lieu deux jours après la greffe des cellules U87 sur la CAM. Nous avons réalisé l'analyse de l'expression génique par microarray avant et après le switch angiogénique et mis en évidence plusieurs gènes également impliqués dans la progression du glioblastome chez l'homme. Notre système expérimental d'angiogenèse tumorale semble donc récapituler plusieurs des aspects majeurs du développement tumoral observé chez l'homme. Il est de plus rapide et économique (Hagedorn *et al.*, 2005).

II — HYPOXIE, ANGIOGÈNE ET PROTÉINES MATRICIELLES

Équipe : S. GERMAIN, C. MONNOT, L. MULLER, A. BARRET,
C. ARDIDIE-ROBOUANT, J. PHILIPPE, E. ÉTIENNE, E. GOMEZ, A. CAZES,
S. LE JAN, A. GALAUP, C. CHOMEL, M. BIGNON, S. WAGNER

Cette équipe a été créée au cours de l'année 2004-2005, autour de trois chercheurs travaillant depuis plusieurs années dans le laboratoire, Stéphane Germain, Laurent Muller et Catherine Monnot. La constitution de cette nouvelle équipe correspond à un souhait initial de S. Germain de développer un programme de recherche sur la caractérisation de nouveaux gènes induits par l'hypoxie. Ce travail repose sur l'hypothèse suivante : chacun de ces gènes peut constituer un marqueur diagnostique et/ou une cible thérapeutique des processus tumoraux et/ou ischémiques où l'angiogénèse est induite par l'hypoxie. La preuve de ce concept a maintenant été validée par la caractérisation de l'expression de deux gènes issus de ce criblage différentiel : Angiopoietin-like 4 (ANGPTL4) et Thrombospondine-1 (TSP1) dans les cellules endothéliales et tumorales. Ces deux protéines sur lesquelles se portent nos études, sont des marqueurs de pathologies ischémiques et ont la propriété commune d'interagir avec la matrice extracellulaire : ce sont des protéines matricellulaires.

Nous étudions le rôle et la fonction des protéines matricellulaires ANGPTL4 et TSP1 *in vitro* et *in vivo* en relation avec les pathologies ischémiques et tumorales, en développant en synergie une analyse, au niveau cellulaire, des propriétés biologiques d'ANGPTL4 sur les cellules endothéliales et tumorales ainsi que sur les interactions entre ces deux types cellulaires. De plus, nous étudierons le rôle d'ANGPTL4 et TSP1 dans le cadre de la régulation de l'angiogénèse post-ischémique induite par l'hypoxie dans différents modèles animaux dont des souris chez lesquelles ces deux gènes sont invalidés (disponibles au laboratoire).

II-1. Angiopoietin-like 4 (ANGPTL4)

L'ANGPTL4 appartient à la famille des angiopoïétines, protéines impliquées dans la maturation et la stabilisation des vaisseaux ainsi que dans le développement du système lymphatique. Le gène ANGPTL4 code pour une protéine de 406 acides aminés, comprenant trois domaines caractéristiques de cette famille : une séquence signal de sécrétion, un domaine coiled-coil, un domaine fibrinogène-like.

Nous avons montré qu'ANGPTL4 est : 1) induite par l'hypoxie (ARNm et protéine), 2) possède une activité pro-angiogénique dans le modèle de la membrane chorio-allantoïde de poulet, 3) est exprimé lors des pathologies ischémiques et 4) est un marqueur spécifique des cancers conventionnels du rein (Le Jan *et al.*, 2003).

a) *ANGPTL4 et modèles tumoraux*

Ayant émis l'hypothèse qu'ANGPTL4 pouvait modifier le micro-environnement tumoral et ainsi affecter les cellules tumorales mais aussi les cellules endothéliales intratumorales, nous avons montré qu'ANGPTL4 inhibe les processus métastatiques. En collaboration avec Lluís Mir (CNRS UMR 8121, IGR, Villejuif), la technique d'électrotransfert d'ADN a été utilisée pour exprimer ANGPTL4 *in vivo* chez la souris. Nous montrons que les cellules de carcinome pulmonaire 3LL xénotransférées sous la peau de souris nude métastasent moins dans les poumons des souris électrotransférées avec ANGPTL4 que chez les souris contrôle. Un phénotype moins agressif de la tumeur primaire est observé, suggérant qu'ANGPTL4 affecte les propriétés d'intravasation des cellules tumorales. De plus, les cellules de mélanome murin B16 transfectées par ANGPTL4 métastasent moins dans les poumons des souris, après injection dans le sinus rétro-orbital. Celles-ci forment des nodules qui restent intravasculaires au niveau pulmonaire, montrant qu'ANGPTL4 inhibe aussi le processus d'extravasation. L'inhibition de la perméabilité vasculaire a été confirmée par un test de Miles en réponse à l'histamine.

In vitro, l'expression d'ANGPTL4 par les cellules B16 inhibe leurs propriétés de migration (wound healing assay), d'invasion (agarose drop assay) et d'adhésion (crystal violet assay). Ces phénomènes s'accompagnent d'une désorganisation du cytosquelette d'actine des cellules exprimant ANGPTL4 mesuré par un marquage de l'actine par la phalloïdine. La formation de points focaux d'adhésion objectivés par un marquage de la vinculine est aussi fortement réduite. Ces résultats montrent qu'ANGPTL4 inhibe les processus métastatiques en affectant la perméabilité vasculaire et les propriétés de motilité et d'invasion des cellules tumorales. L'ensemble de ces résultats fait l'objet d'un article soumis à publication (Galaup *et al.*).

b) *ANGPTL4 et cellules vasculaires*

L'expression d'ANGPTL4 étant induite par l'hypoxie dans les cellules endothéliales, nous avons émis l'hypothèse qu'ANGPTL4 pourrait exercer un rôle modulateur de l'angiogenèse sur les cellules de la paroi vasculaire. Nous avons alors montré qu'ANGPTL4 est une protéine sécrétée dans les cultures primaires d'HUVEC soumises à l'hypoxie, présente sous deux formes distinctes : 1) ANGPTL4 soluble, présente dans le milieu de culture et soumise à une protéolyse extracellulaire (forme longue de 55kDa et protéolysée de 35 kDa), 2) ANGPTL4 matricielle, associée à la matrice extracellulaire subendothéliale et non protéolysée (50 kDa). Cette forme matricielle interagit très fortement avec la matrice extracellulaire, en particulier par l'intermédiaire des héparanes sulfates protéoglycans. Nous avons alors envisagé que cette interaction matricielle d'ANGPTL4 participe, à la constitution d'un réservoir de molécules bioactives, au cours de processus hypoxiques, modifiant la fonction des cellules endothéliales. Des tests fonctionnels *in vitro* ont été réalisés avec un système de matrices

conditionnées de cellules HEK exprimant de façon stable ANGPTL4, mettant à profit la forte concentration de la protéine dans la matrice extracellulaire. Nos résultats montrent que la présence d'ANGPTL4 matricielle inhibe l'adhésion des cellules endothéliales, par rapport à une matrice contrôle (Crystal Violet). Ce processus s'accompagne d'un étalement intermédiaire des HUVEC, associé à une diminution des fibres de stress (rhodamine-phalloïdine) et des points focaux d'adhésion (vinculine), visualisés par immunofluorescence en microscopie confocale. Au contraire, ANGPTL4 matricielle ne modifie pas l'adhésion des cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV). ANGPTL4 dans la matrice extracellulaire inhibe également la migration des cellules endothéliales induite par le sérum ou le VEGF en chambre de Boyden. Ainsi, ANGPTL4 matricielle, synthétisée en situation hypoxique, module l'adhésion et la migration des cellules endothéliales, sans modifier le comportement des CMLV. Ces résultats font l'objet d'une publication en préparation (Cazes *et al.*).

II-2. Thrombospondine-1 (TSP1)

La TSP1 est une glycoprotéine matricielle interagissant avec des composants de la MEC et de multiples partenaires cellulaires. Elle est impliquée dans les processus d'inflammation, de réparation tissulaire et d'angiogenèse. Dans les cellules tumorales, la répression de l'expression de TSP1 est impliquée dans la levée de l'inhibition de l'angiogenèse associée à l'augmentation de l'expression concomitante du VEGF, de son récepteur VEGFR2 et à des hauts niveaux de MMP9. Son rôle est bien identifié dans les pathologies tumorales, mais encore mal caractérisé dans les pathologies ischémiques.

Nous avons étudié son expression sur des prélèvements de jambes obtenus après amputation pour ischémie critique des membres inférieurs en collaboration avec le service de Médecine Vasculaire de l'Hôpital Européen Georges Pompidou. Chez tous les patients (n = 13), l'ARNm *tsp1* repéré par hybridation *in situ* est exprimé dans les cellules vasculaires (endothéliales et musculaires lisses) et inflammatoires (macrophages) est spécifique du tissu ischémique. En contrôle, l'ARNm *tsp1* n'est pas exprimé dans la partie « non ischémique » proche du site d'amputation. Le niveau d'induction de l'expression de l'ARNm a été caractérisé (20X) par PCR quantitative en temps réel et nous avons montré, par western-blot, que la protéine est aussi exprimée dans le tissu ischémique (Favier J. *et al.*, sous presse).

III — ANGIOGENÈSE ET PATHOLOGIE CARDIOVASCULAIRE

Équipe : P. CORVOL, G. NGUYEN, C. HUBERT, J.-M. GASC, N. LAMANDÉ,
A. MICHAUD, M.-T. MORIN, I. QUEGUINER, S. FILLAT, A. CONTREPAS,
K. SAVARY, G. SIHN, E. LARGER, G. SENO DI MARCO, F. VINCENT

III-1. Système Rénine-Angiotensine

Les travaux du laboratoire sur le système rénine-angiotensine se sont poursuivis dans plusieurs directions :

a) *Rôle du système rénine dans l'érythropoïèse primitive chez l'embryon de poulet*

Ce travail fait suite à une observation que nous avons faite chez les souris dont le gène de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE) avait été inactivé. Ces souris présentent une anémie isolée, normochrome, normocytaire. L'anémie était en rapport avec l'inactivation du système rénine-angiotensine puisque la perfusion d'angiotensine II était capable de normaliser les taux d'hématocrite des souris ACE *-/-*. Ce premier travail démontrait l'implication de l'angiotensine II dans l'érythropoïèse définitive chez l'adulte. Nous avons exploré le rôle possible du système rénine-angiotensine dans l'érythropoïèse primitive dans le modèle de l'embryon de poulet. Nous avons détecté la présence d'une activité enzymatique ACE dans l'aire extra-embryonnaire du poulet, quelques heures après l'incubation. Nous avons cloné les autres composants du système rénine-angiotensine du poulet (rénine, angiotensinogène, récepteurs de l'angiotensine II). Ces constituants du système rénine se trouvent à proximité immédiate des îlots sanguins suggérant que ce système pouvait être impliqué dans l'érythropoïèse. Ce rôle a été confirmé par le blocage *in vivo* du système rénine avec un inhibiteur de l'ACE ou par un antagoniste du récepteur de l'angiotensine II. Dans les deux cas, l'hématocrite s'abaisse de 15 %, montrant que le système rénine-angiotensine joue un rôle important dans l'érythropoïèse primitive extra-embryonnaire chez le poulet (Savary K. *et al.*, 2005).

Ce travail se poursuit par la recherche de l'expression et du rôle du système rénine-angiotensine dans l'hématopoïèse primitive chez l'embryon de souris. Les cellules hématopoïétiques du sac vitellin de souris normale ou de souris dont le gène de l'ACE a été inactivé seront isolées, cultivées en présence ou non de bloqueurs du système rénine-angiotensine. Il sera ainsi possible de savoir si le système rénine affecte la prolifération et/ou la différenciation des cellules souches hématopoïétiques chez le mammifère.

b) *Effets de l'inactivation génique de l'ACE ou de son inhibition pharmacologique sur les taux des peptides angiotensine et bradykinine*

Il a été montré récemment que la formation de l'angiotensine II pouvait se faire par d'autres voies que la voie classique impliquant l'ACE. Il a été proposé que dans le rein, le cœur et le poumon d'autres voies que l'ACE pourraient conduire à la formation d'angiotensine II. Nous avons étudié les taux d'angiotensine I et II dans le sang, le rein et le cœur chez les animaux dont l'ACE a été inactivée génétiquement ou dont l'ACE a été bloqué par une dose maximale d'inhibiteur d'ACE. Parallèlement, nous avons mesuré le taux de bradykinine (1-9) ainsi que le métabolite principal de la bradykinine résultant de l'action de l'ACE (BK 1-7). Les taux d'angiotensine II sont réduits de 90 à 97 % dans le sang, de 92 à 99 % dans le rein, de 93 à 99 % dans le cœur et de 97 % dans le poumon. La baisse très marquée du rapport angiotensine II/angiotensine I indique

que l'ACE est responsable pour au moins 90 % de la conversion de l'angiotensine I en angiotensine II dans le sang et dans les organes examinés. En revanche, l'ACE joue un rôle moins important dans le métabolisme de la bradykinine (1-9) dans le rein et dans le cœur (Campbell D.J. *et al.*, 2004).

c) Rôle du domaine catalytique N-terminal de l'ACE chez la souris

L'ACE est composé de deux domaines homologues, chacun d'entre eux possédant un site catalytique indépendant. Afin d'étudier *in vivo* le rôle physiologique des deux domaines catalytiques de l'ACE, nous avons produit des souris génétiquement modifiées chez lesquelles le site catalytique N-terminal de l'ACE a été inactivé. L'activité enzymatique du domaine C-terminal ainsi que l'expression de l'ACE n'est pas modifiée. En outre, l'ACE testiculaire n'est pas impliquée dans cette mutation. L'analyse de ces animaux génétiquement modifiés (knock-in) montre que ces souris ont des taux normaux d'angiotensine II. Toutefois, elles présentent une élévation des taux plasmatiques et urinaires du tétrapeptide Ac-SDKP (SDKP) que nous avons montré antérieurement être un substrat physiologique spécifique du domaine N-terminal de l'ACE. SDKP est *in vitro* un régulateur négatif de l'hématopoïèse. Malgré l'élévation de SDKP, ces souris ne sont pas anémiques. Par ailleurs, ces souris ont une pression artérielle et une fonction rénale normale, similaire à celle des souris sauvages. Cette étude montre qu'*in vivo* le domaine catalytique C-terminal de l'ACE est suffisant pour le maintien d'un système rénine-angiotensine fonctionnel. Il montre aussi que l'anémie des souris dont le gène de l'ACE a été complètement inactivé n'est pas lié à l'accumulation du tétrapeptide SDKP (Fuchs S. *et al.*, 2004).

Ces travaux sont poursuivis actuellement par une recherche similaire sur l'activité catalytique *in vivo* du domaine C-terminal de l'ACE. Un knock-in est en cours de réalisation. Les souris ainsi générées ne devraient plus présenter que l'activité du domaine N-terminal de l'ACE. L'activité catalytique du domaine C-terminal sera inactivée. Il sera particulièrement intéressant d'étudier la capacité de reproduction des souris mâles dont le domaine C-terminal a été inactivé. L'activité catalytique de l'enzyme testiculaire ayant été inactivée, nous pourrions vérifier si ces souris sont fécondes, comme le suggère un rapport récent de la littérature attribuant à l'ACE testiculaire un rôle dans la fécondation portée par une activité de solubilisation des protéines insérées dans la membrane par une ancre GPI (Kondoh *et al.*, Nat. Med. 2005). Cette activité catalytique est distincte de l'activité enzymatique peptidasique de l'ACE.

III-2. Rôle de la Fibronectine Protéase dans la Migration des Cellules Tumorales

La fibronectine (Fn) est une protéine de la matrice extracellulaire susceptible d'être protéolysée. La Fn-protéinase est issue de la Fn après protéolyse partielle. Par ailleurs, une isoforme de la Fn est générée par épissage alternatif du mRNA

et correspond à la Fn-protéinase. Nous avons montré que la Fn-protéinase recombinante présente la séquence consensus du site catalytique des métallopeptidases à zinc, HEXXH. La mutation des acides aminés clés du site catalytique de la Fn-protéinase abolit son activité. Nous avons montré que le mRNA codant pour la Fn-protéinase est nettement exprimé dans les tumeurs mammaires mais peu ou pas exprimé dans le tissu sain normal. Son niveau d'expression semble lié au caractère invasif des tumeurs mammaires. La transfection de cellules mammaires MCF-7 non invasives transforme le phénotype de ces cellules : elles deviennent invasives et leur invasion dépend de l'activité Fn-protéinase. L'ensemble de ces résultats suggère que la Fn-protéinase peut être impliquée dans la progression tumorale (Houard X. *et al.*, 2005).

III-3. Angiogenèse et diabète

Le diabète s'accompagne d'une angiogenèse anormale : il existe une angiogenèse excessive au niveau de la rétine et une angiogenèse déficiente en réponse à une ischémie myocardique ou des membres inférieurs. Toutefois, peu de données concernent l'effet d'une élévation de la glycémie sur la formation des vaisseaux au cours du développement. Nous avons choisi d'étudier l'effet d'une hyperglycémie de courte durée sur l'angiogenèse dans le modèle de la membrane chorioallantoïdienne de poulet (CAM) pour plusieurs raisons : 1) étude d'une modeste élévation de la glycémie (Nx2) sur sept jours, 2) facilité d'observation *in ovo* des effets de l'hyperglycémie au cours d'une néo-angiogenèse active, 3) à l'inverse des modèles de développement embryonnaire chez les mammifères, le modèle de la CAM permet de s'affranchir des influences maternelles, 4) bonne maîtrise de la CAM et de l'étude du développement cardiovasculaire de l'embryon de poulet par notre équipe. Nous avons induit une hyperglycémie chez l'embryon de poulet de sept jours par une injection unique de glucose dans le vitellus. L'hyperglycémie décroît l'angiogenèse dans ce modèle à partir du 5^e jour post-injection. Le patron d'expression des principaux gènes des facteurs de croissance vasculaire et de leurs récepteurs n'est pas modifié par l'hyperglycémie (hybridation *in situ* et RT-PCR semi-quantitative). Deux jours après l'induction de l'hyperglycémie, on observe une augmentation de l'apoptose des cellules endothéliales et des péricytes. Durant le même temps, on observe une diminution de la prolifération des cellules endothéliales (Larger E. *et al.*, 2004).

L'hyperglycémie peut ainsi altérer l'angiogenèse sans modifier le niveau d'expression des facteurs de croissance vasculaire. Les mécanismes cellulaires et moléculaires de cet effet seront étudiés. La formation irréversible de produits avancés de glycation est l'une des quatre voies intracellulaires activées par l'hyperglycémie. Nous étudierons l'effet de l'administration de produits avancés de glycation dans le vitellus en comparaison avec celle de glucose. Il sera aussi possible d'inhiber la formation de produits avancés de glycation par l'utilisation d'un anticorps dirigé contre le récepteur des produits avancés de la glycation ou par un récepteur soluble.

IV — GÉNÉTIQUE ET CLINIQUE DE L'HYPERTENSION ARTÉRIELLE

Équipe : X. JEUNEMAITRE, M.-C. ZENARO, J. HADCHOUEL, G. BEURAIN, A.-P. GIMENEZ-ROQUEPLO, M. CAPRIO, A. CLAES, C. DELALOY, A.-M. HOUOT, J. FAVIER, L.M. ZHU, J. PERDU

L'hypertension artérielle (HTA) représente l'exemple même d'une maladie complexe, soumise à de multiples facteurs génétiques et environnementaux divers. Une des particularités des approches que nous mettons en œuvre est la complémentarité entre les équipes clinique et génétique de l'HEGP et celles travaillant au sein de l'Unité 36. Notre stratégie est basée sur : 1) l'identification de variants fonctionnels qui peuvent jouer un rôle dans l'homéostasie hydrosodée et la régulation de la pression artérielle ; 2) la recherche de formes mendéliennes de la pathologie et l'identification de nouveaux gènes ; 3) l'analyse de formes secondaires de la pathologie : fibrodysplasie artérielle rénale, hyperaldostéronisme primaire, phéochromocytomes), de même que focaliser une partie de nos études sur des formes rares héréditaires d'HTA. Une des découvertes importantes est l'identification de 2 gènes (WNK1 et WNK4) appartenant à une nouvelle famille de sérine/thréonine kinases, comme impliqués dans l'hypertension artérielle hyperkaliémique familiale (syndrome de Gordon).

IV-1. Identification de gènes impliqués dans des formes monogéniques d'hypertension artérielle : rôle de WNK1 et WNK4

Une des contributions majeures de notre groupe est l'identification en 2001 de 2 gènes (WNK1 et WNK4) appartenant à une nouvelle famille de sérine/thréonine kinases, comme impliqués dans l'hypertension artérielle hyperkaliémique familiale (HHF ou syndrome de Gordon). Une grande partie des activités et des projets de l'équipe est maintenant tournée vers l'étude de la régulation de l'expression de ces gènes *in vitro* et *in vivo*, la création de modèles animaux transgéniques, la recherche de partenaires. Au cours des dernières années, nous avons collecté 30 cas-index et 15 familles et nous avons montré une grande variabilité intrafamiliale mais aussi interfamiliale du phénotype. Au cours de l'année 2004-5, nous avons poursuivi l'analyse *in vivo* et *in vitro* de la régulation de l'expression *in vitro* du gène WNK1, exprimé sous forme de 2 transcrits tissu-spécifiques qui diffèrent par leur portion 5'. Le transcrit long de WNK1 est préférentiellement exprimé dans le cœur, le muscle squelettique, le testicule et le cerveau, alors que le transcrit court est très largement majoritaire dans le rein, ceci de façon identique chez l'homme et la souris. Nous avons pu mettre en évidence deux promoteurs proximaux à l'origine de 2 transcrits d'expression ubiquitaire, et un promoteur rénal en amont d'un exon d'expression spécifiquement rénale. Une des découvertes majeures est la présence d'un transcrit rénal sans activité kinase, très fortement exprimé dans le tube contourné distal, qui

suggère comme activité principale de cette isoforme, un mécanisme d'interaction avec d'autres protéines (en particulier par le biais de mécanismes d'autoinhibition).

La création d'animaux génétiquement modifiés constitue l'outil indispensable d'analyse moderne de la fonction de ces gènes. Pour WNK4, nous avons débuté un projet de transgénèse classique en collaboration avec le MDC de Berlin (Dr M. Bader, Dr J. Bohlender), avec surexpression du gène dans le tubule rénal, en utilisant un promoteur spécifique du tubule distal rénal. Pour WNK1, une autre approche a été débutée dans notre laboratoire, basée sur la similarité de structure génique entre le gène humain et murin et sur la fonctionnalité présumée des délétions de l'intron 1 responsables de la pathologie humaine. Des résultats très encourageant ont pu être obtenus montrant l'expression du gène WNK1 dans le cœur et les vaisseaux, ce qui ouvre des perspectives intéressantes sur le rôle de cette enzyme dans ces tissus. Des souris hétérozygotes devraient être obtenues en fin d'année 2004.

Identification d'autres gènes responsables du PHA2 par criblage du génome :
La collection de familles supplémentaires nous a permis tester la liaison entre les sujets atteints de trois familles et d'exclure les trois loci candidats déjà connus. Nous avons ainsi montré que le PHA2 faisait intervenir au moins un 4^e locus. Nous avons poursuivi la caractérisation de 7 familles qui semblaient les plus intéressantes, tant sur le plan de leur phénotype que de leur informativité. Une analyse de génome entier a été effectuée en collaboration avec le Centre National de Génotypage (CNG, Mark Lathrop). Trois nouveaux loci sont suggérés. Nous espérons l'identification d'un nouveau gène responsable de la maladie au cours de l'année 2006.

IV-2. Analyse de variants fonctionnels (Département de Génétique et CIC, HEGP)

Deux études originales ont débuté à partir des résultats obtenus au cours des dernières années. La première est une étude de pharmacogénétique effectuée chez des fratries hypertendues avec l'objectif de déterminer les déterminants de la réponse aiguë et chronique au candésartan, inhibiteur des récepteurs de l'angiotensine II. Cette étude, effectuée au CIC de l'HEGP, a inclus 30 fratries hypertendues (60 sujets) avec des mesures répétées cliniques et biologiques et permettra l'analyse des éventuelles relations génotypes — réponse médicamenteuse. Des résultats novateurs ont été obtenus avec des relations familiales fortes sur la réponse aiguë de la rénine et de la natriurèse à l'administration de cortisol. Les éventuelles relations avec des polymorphismes du gène de la rénine sont en cours d'étude.

La seconde étude, financée initialement par un programme ACI en 2000 puis par un PHRC 2001-3, concerne l'étude chez le volontaire sain de l'impact des variations interindividuelles de kallikréine sur l'homéostasie hydrosodée, le méta-

bolisme phosphocalcique et le flux artériel endothélium-dépendant. Nous avons identifié un polymorphisme (R53H) du gène de la kallikréine rénale, et démontré son impact fort sur l'activité enzymatique de la kallikréine (absence quasi complète d'activité enzymatique). L'étude clinique effectuée en 2003-4 confirme la relation entre polymorphisme génétique R53H et l'excrétion urinaire de kallikréine, montre l'influence du rythme nyctéméral et du régime sodé sur cette excrétion. Surtout, nous avons retrouvé une diminution du diamètre vasculaire périphérique en présence de la mutation R53H, ce qui confirme pour la 1^{re} fois *in vivo* chez l'homme le rôle du système kallikréine-kinine dans le tonus et la structure vasculaire.

IV-3. Phéochromocytomes et Paragangliomes

Nous avons participé à établir le rôle crucial de 2 gènes codant pour deux sous-unités (SDHD et SDHC) du complexe II de la chaîne respiratoire mitochondriale dans la genèse des phéochromocytomes et des paragangliomes héréditaires. En dehors de l'identification de familles avec déficit en SDHD et SDHB, nous avons montré l'association entre angiogénèse et tumorigénèse dans ces tumeurs. Nous avons aussi déterminé l'incidence des mutations somatiques et constitutionnelles des gènes *SDHD* et *SDHC* dans les phéochromocytomes sporadiques et leur rôle éventuel dans le caractère malin des tumeurs. À ce titre, nous avons récemment démontré le rôle pronostique (sévérité, localisation, récurrence, malignité) de mutations du gène *SDHB*. Notre objectif est d'identifier les mécanismes moléculaires qui font le lien entre mutations *SDHs* et tumorigénèse. L'étude de ces mécanismes est effectuée à l'aide de modèles cellulaires et la création d'un modèle animal avec inactivation conditionnelle et tissu-spécifique de *SDHB*. Nous avons mis en place un réseau national de la pathologie PGL. NET financé par le GIS-Institut des Maladies Rares et un Programme Hospitalier de Recherche Clinique (PHRC National 2004) dédié à l'étude de l'impact du test génétique dans la prise en charge de ces tumeurs.

IV-4. Hyperaldostéronisme primaire

L'hyperaldostéronisme primaire (HAP) est une forme commune d'HTA endocrine, dont la prévalence est actuellement estimée à 6 % des HTA vues dans un service spécialisé. Notre objectif est d'en élucider certains mécanismes moléculaires. En association avec l'Unité d'HTA de l'HEGP (Pr P.F. Plouin), le service de génétique de l'HEGP a collecté environ 500 ADN de sujets avec HAP. À partir de ces cas index, nous avons sélectionné 12 familles sur la base de la présence d'un HAP chez au moins 2 sujets apparentés au 1^{er} degré et montré que cette atteinte familiale était compatible avec une nouvelle forme d'hyperaldostéronisme primaire de type 2 (FH-2), uniquement décrite auparavant par un groupe Australien. Notre projet est de caractériser les apparentés de ces familles tant sur le plan clinique (PA) que biologique et hormonal (rénine, aldostérone),

l'hypothèse étant celle d'un continuum entre déséquilibre primaire de la sécrétion d'aldostérone uniquement biologique et HAP authentique. Sur la ou les familles suffisamment informatives, nous conduirons un criblage du génome entier, après proposition de ce projet au conseil scientifique du CNG (Pr M. Lathrop, Évry, France). En complément, la comparaison des fréquences de polymorphismes de gènes candidats entre sujets dans le cadre de larges études cas-témoins sera effectuée. Nous avons aussi débuté l'analyse du profil d'expression génique des adénomes de Conn. L'objectif est d'identifier des signatures spécifiques de sous-groupes de tumeurs à mécanisme pathogénique différent.

IV-5. Fibrodysplasie musculaire de l'artère rénale et autres pathologies artérielles

La dysplasie fibromusculaire (DFM), est une artériopathie systémique d'origine inconnue, qui touche les artères musculaires de moyen calibre en particulier les atteintes rénales (HTA) et cérébrales (AVC). L'identification de gènes de susceptibilité est rendue difficile par le caractère souvent asymptomatique des lésions. Nous avons effectué depuis 1995-6 un effort systématique d'évaluation familiale de la DFM et avons identifié environ 10 % de cas familiaux. Une cohorte unique de plus de 250 cas de DFM a été collectée dans le cadre d'une recherche clinique promue par l'INSERM (RBM 00-028) et animée par A.P. Gimenez-Roqueplo. L'analyse phénotypique carotidienne par échographie de haute résolution effectuée par l'EMI 301 (S. Laurent, P. Boutouyrie) a permis de mettre en évidence des anomalies qualitatives (aspect de « triple signal ») et quantitatives particulières à cette pathologie. Nous poursuivons la caractérisation vasculaire de 16 familles larges et suffisamment informatives (> 75 individus) pour permettre une analyse de l'héritabilité des paramètres vasculaires quantitatifs et qualitatifs et de leur interaction avec des co-facteurs (âge, sexe), préalable indispensable à une analyse de liaison génétique à la recherche de gènes de susceptibilité.

Nous avons également caractérisé une grande famille souffrant d'une pathologie vasculaire aortique disséquante et d'un nombre anormalement important de persistance du canal artériel. L'analyse génétique initiale a permis d'exclure 8 gènes ou loci candidats, puis un tour du génome nous a permis de localiser le gène responsable sur le chromosome 16. L'identification du défaut moléculaire est en cours. En dehors des syndromes de Marfan et d'Ehler-Danlos vasculaire, aucun autre gène n'avait pour le moment été identifié comme responsable des anévrysmes de l'aorte ascendante. La persistance du canal artériel (PCA) est une pathologie cardiovasculaire présente chez environ 1/2000 enfants et dont les mécanismes primaires intimes ne sont pas connus. L'identification de cette nouvelle entité physiopathologique artérielle vasculaire associant AAT/AD et PCA, devrait permettre d'éclairer d'un jour nouveau les mécanismes de ces 2 traits complexes.

LISTE DE PUBLICATIONS DU LABORATOIRE 2004-2005

2004

RIVIÈRE G., MICHAUD A., DELOFFRE L., VANDENBULCKE F., LEVOYE A., BRETON C., CORVOL P., SALZET M. and VIEAU D. Characterization of the first non-insect invertebrate functional angiotensin converting enzyme: leech TtACE resembles the N-domain of mammalian ACE. *Biochem. J.* 382 : 565-573, 2004.

FOURNIE-ZALUSKI M.-C., FASSOT C., VALENTIN B., DJORDIJEVIC D., REAUX-LE GOAZIGO A., CORVOL P., ROQUES B.-P. and LLORENS-CORTES C. Brain renin-angiotensin system blockade by systematically active aminopeptidase A inhibitors : a potential treatment of salt-dependent hypertension. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101 : 7775-7780, 2004.

CHARRIER S., MICHAUD A., BADAOUI S., GIROUX S., EZAN E., SAINTENY F., CORVOL P. and VAINCHENKER W. Inhibition of angiotensin I-converting enzyme induces radioprotection by preserving murine hematopoietic short-term reconstituting cells. *Blood* 104 : 978-985, 2004.

JUILLERAT-JEANNERET L., CELERIER J., CHAPUIS BERNASCONI C., NGUYEN G., WOSTL W., MAERKI H.P., JANZER R.C., CORVOL P. and GASC J.-M. Renin and angiotensinogen expression and functions in growth and apoptosis of human glioblastoma. *Br. J. Cancer* 90 : 1059-1068, 2004.

LARGER E., MARRE M., CORVOL P. and GASC J.-M. Hyperglycemia-induced defects in angiogenesis in the chicken chorioallantoic membrane model. *Diabetes* 53 : 752-761, 2004.

CAMPBELL D.J., ALEXIOU T., XIAO H.D., FUCHS S., MCKINLEY M.J., CORVOL P. and BERNSTEIN K.E. Effect of reduced angiotensin-converting enzyme gene expression and angiotensin-converting enzyme inhibition on angiotensin and bradykinin peptide levels in mice. *Hypertension* 43 : 854-859, 2004.

FUCHS S., XIAO H.D., COLE J.M., ADAMS J.W., FRENZEL K., MICHAUD A., ZHAO H., KESHELAVA G., CAPECCHI M.R., CORVOL P. and BERNSTEIN K.E. Role of the N-terminal catalytic domain of angiotensin-converting enzyme investigated by targeted inactivation in mice. *J. Biol. Chem.* 279 : 15946-15953, 2004.

PINET F., POIRIER E., FUCHS S., THARAUX P.L., CARON M., CORVOL P., MICHEL J.-B. and JOUBERT-CARON R. Troponin T as a marker of differentiation revealed by proteomic analysis in renal arterioles. *FASEB J.* 48 : 585-586, 2004.

SUZUKI Y., KOMI Y., ASHINO H., YAMASHITA J., INOUE J., YOSHIKI A., EICHMANN A., AMANUMA H. and KOJIMA S. Retinoic acid controls blood vessel formation by modulating endothelial and mural cell interaction via suppression of Tie2 signaling in vascular progenitor cells. *Blood* 104 : 166-169, 2004.

TOURNAIRE R., SIMON M.P., LE NOBLE F., EICHMANN A., ENGLAND P. and POUYSSEUR J. A short synthetic peptide inhibits signal transduction, migration and angiogenesis mediated by Tie2 receptor. *EMBO Rep.* 5 : 262-267, 2004.

LE NOBLE F., MOYON D., PARDANAUD L., YUAN L., DJONOV V., MATTHIJSSEN R., BREANT C., FLEURY V. and EICHMANN A. Flow regulates arterial-venous differentiation in the chick embryo yolk sac. *Development* 131 : 361-375, 2004.

DECROUY X., GASC J.-M., POINTIS G. and SEGRETAINE D. Functional characterization of Cx43 based Gap-junctions during spermatogenesis. *J. Cell. Physiol.* 200 : 146-154, 2004.

MICHINEAU S., MULLER L., PIZARD A., ALHENC-GELAS F. and RAJERISON R.M. N-linked glycosylation of the human bradykinin B₂ receptor is required for optimal cell-surface expression and coupling. *Biol. Chem.* 395 : 39-47, 2004.

ROZENFELD R., MULLER L., MESSARI S.E., LLORENS-CORTES C. The C-terminal domain of aminopeptidase A is an intramolecular chaperone required for the correct folding, cell surface expression, and activity of this monozinc aminopeptidase. *J. Biol. Chem.* 279 : 43285-43295.

ROUSSEL R., TREGOUET D.A., HADJADI S., JEUNEMAITRE X. and MARRE M. Investigation of the human ANP gene in type I diabetic nephropathy : case-control and follow-up studies. *Diabetes* 53 : 1394-1398, 2004.

SEELY E.W., BROSHINAN K.B., JEUNEMAITRE X., OKAMURA K., WILLIAMS G.H., HOLLENBERG N.K. and HERRINGTON D.M. Effects of conjugated oestrogen and droloxifene on the renin-angiotensin system, blood pressure and renal blood flow in postmenopausal women. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* 60 : 315-321, 2004.

WINICKI M., ACCURSO V., HOFFMANN M., PAWLOWSKI R., DORIGATTI F., SANTONASTASO M., LONGO D., KRUPA-WOJCIECHOWSKA B., JEUNEMAITRE X., PESSINA A.C., SOMERS V.K., PALATINI P. and HARVEST Study Group. Physical activity and angiotensin-converting enzyme gene polymorphism in mild hypertensives. *Am. J. Med. Genet.* 125A : 38-44, 2004.

KHAU VAN KIEN P., WOLD J.E., MATHIEU F., ZHU L., SALVE N., LALANDE A., BONNET C., LESCA G., PLAUCHU H., DELLINGER A., NIVELON-CHEVALLIER A., BRUNOTTE F. and JEUNEMAITRE X. Familial thoracic aortic aneurysm/dissection with patent ductus arteriosus : genetic arguments for a particular pathophysiological entity. *Eur. J. Hum. Genet.* 12 : 173-180, 2004.

LU X*, LE NOBLE F.*, YUAN L.*, JIANG Q., DE LAFARGE B., SUGIYAMA D., BREANT C., CLAES F., DE SMET F., THOMAS J.L., AUTIERO M., CARMELIET P., TESSIER-LAVIGNE M. and EICHMANN A. The netrin receptor Unc5B mediates guidance events controlling morphogenesis of the vascular system. *Nature* 432, 179-186, 2004 (* contribution égale).

FILALI M., LE JEUNNE C., DURAND E., GRINDA J.M., ROETTO A., DARAIO F., BRUNEVALL P., JEUNEMAITRE X. and GIMENEZ-ROQUEPLO A.-P. Juvenile hemochromatosis HJV-related revealed by cardiogenic shock. *Blood Cell. Mol. Dis.* 33 : 120-124, 2004.

GUMENIAK O., PERLSTEIN T.S., HOPKINS P., BROWN N.I., JEUNEMAITRE X., HOLLENBERG N. and WILLIAMS G.H. Thyroid function and blood pressure homeostasis in euthyroid subjects. *J. Clin. Endocr. Metab.* 89 : 3455-3461, 2004.

ZANTOUR B., GUILHAUME B., TISSIER F., LOUVEL A., JEUNEMAITRE X., GIMENEZ-ROQUEPLO A.-P. and BERTAGNA X. A thyroid nodule revealing a paraganglioma in a patient with a new germline mutation in the succinate dehydrogenase B (SDHB) gene. *Eur. J. Endocrinol.* 151 : 433-438, 2004.

Revues et ouvrages

CORVOL P. Gene and cell therapy in cardiovascular diseases : still a long way to go. *Thérapie.* 59 : 1-4, 2004.

NGUYEN G., BURCKLE C.A. and SRAER J.D. Renin/prorenin-receptor biochemistry and functional significance. *Curr. Hypertens. Rep.* 6 : 129-132, 2004.

NGUYEN G., BURCKLE C. and TREMEY B. The cardiac renin receptors. In : *Renin Angiotensin System and the Heart*, Eds : Walmor De Mello, John Wiley & Sons, p. 6, 2004.

FLEURY V., NGUYEN T.-H., EICHMANN A. and LE NOBLE F. (2004). La sculpture des vaisseaux sanguins. *Pour la Science* 44, 2-6, 2004.

EICHMANN A., LE NOBLE F. et PARDANAUD L. Différenciation artéro-veineuse : génétique ou hémodynamique ? *Medecine Sciences* 20, 626-628, 2004.

CORVOL P. [Ontogenesis of the renin system. Implication of this system in hematopoiesis]. *Bull. Acad. Natl. Med.* 188 : 631-636 ; discussion 636-637, 2004.

CORVOL P. and LIBERSA C. [A meeting of clinical investigation centers]. *Thérapie* 59 : 143, 2004.

NGUYEN G. and BURCKLE C.A. [The (pro)renin receptor : biology and functional significance]. *Bull. Acad. Natl. Med.* 188 : 621-628 ; discussion 628-629, 2004.

PINET F., POIRIER F., FUCHS S., THARAUX P.L., CARON M., CORVOL P., MICHEL J.B. and JOUBERT-CARON R. [Proteomic analysis of proteins involved in the renal phenotype in renovascular hypertension]. *Thérapie* 59 : 13-20, 2004.

JULLERAT-JEANNERET L., GASC J.-M. and CORVOL P. [The renin-angiotensin system in human brain and brain tumors : a function unrelated to blood pressure control ?]. *Bull. Acad. Natl. Med.* 188 : 639-646 ; discussion 647-648, 2004.

JEUNEMAITRE X. Genetics of the human renin angiotensin system. In *Handbook of Experimental Pharmacology : Angiotensin*, B. Schoelkens and T. Unger, Editors ; Springer-Verlag Vol. 163/Part2 ; pp. 173-206, 2004.

JEUNEMAITRE X. Genetics of diabetic complications : nephropathy. *Ann. Endocrinol.* 65 (1 Suppl.) : 10-16, 2004.

GIMENEZ-ROQUEPLO A.-P., PLOUIN P.-F., TRAN BA HUY P., JEUNEMAITRE X. et l'ensemble des membres du réseau PGL.NET. SDHD et SDHB, deux gènes majeurs pour le déterminisme génétique des paragangliomes et des phéochromocytomes. *Médecine Clinique Endocrinologie et Diabète* 9 : 49-55, 2004.

PLOUIN P.-F. and JEUNEMAITRE X. Would wider screening for primary aldosteronism give any health benefits ? *Eur. J. Endocrinol.* 2004 ; 151 : 305-308.

2005

HAGEDORN M., JAVERZAT S., GILGES D., MEYRE A., DE LAFARGE B., EICHMANN A. and BIKFALVI A. Accessing key steps of human tumor progression *in vivo* using an avian embryo model. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102, 1643-1648, 2005.

SAVARY K., MICHAUD A., FAVIER J., LARGER E., CORVOL P. and GASC J.-M. Role of the renin-angiotensin system in primitive erythropoiesis in the chick embryo. *Blood* 105 : 103-110, 2005.

RAMSER J., ABIDI F.E., BURCKLE C.A., LENSKI C., TORIELLO H., WEN G., LUBS H.A., ENGERT S., STEVENSON R.E., MEINDL A., SCHWARTZ C.E. and NGUYEN G. A unique exonic splice enhancer mutation in a family with X-linked mental retardation and epilepsy points to a novel role of the renin receptor. *Hum. Mol. Genet.* 14 : 1019-1027, 2005.

BALU L., GASC J.-M., BOCCON-GIBOD L., DE VRIES P., BLANC P., GUIGONIS V., DESCHENES G., BENSMAN A. and ULINSKI T. Arterial hypertension and ovarian tumour in a girl : what is the link ? *Nephrol. Dial. Transplant.* 20 : 231-234, 2005.

CORVOL P. ACE sets up fertilization. *Nat. Med.* 11 : 118-119, 2005.

LOGIE A., DUNOIS-LARDE C., ROSTY C., LEVREL O., BLANCHE M., RIBEIRO A., GASC J.-M., JORCANO J., WERNER S., SASTRE-GARAU X., THIERY J.P. and RADVANYI F. Activating mutations of the tyrosine kinase receptor FGFR3 are associated with benign skin tumors in mice and humans. *Hum. Mol. Genet.* 14 : 1153-1160, 2005.

HOUARD X., GERMAIN S., GERVAIS M., MICHAUD A., VAND DEN BRULE F., FOIDART J.-M., NOEL A., MONNOT C. and CORVOL P. Migration-stimulating factor displays HEXXH-dependent catalytic activity important for promoting tumor cell migration. *Int. J. Cancer* 116 : 378-384, 2005.

AZIZI M., BOUTOUYRIE P., BISSERY A., STERN N., BURA-RIVIÈRE A., ALHENGELAS F. and JEUNEMAITRE X. Arterial dysfunction in tissue kallikrein deficient subjects. *Circulation* 115 : 780-787, 2005.

CHRIST M., WEHLING M., KIRSCH E., VIENGCHAREUN S., ZENARO M.-C. and LOMBES M. Enhancement of beta-adrenergic cAMP-signaling by the mineralocorticoid receptor. *Mol. Cell. Endocrinol.* 231 : 23-31, 2005.

Revues et ouvrages

EICHMANN A., MAKINEN T. and ALITALO K. Neural guidance molecules regulate vascular remodeling and vessel navigation. *Genes Dev.* 19 : 1013-1021, 2005.

EICHMANN A., LE NOBLE F., AUTIERO M. and CARMELIET, P. Guidance of vascular and neuronal network formation. *Curr. Op. Neurobiol.* 15 : 108-115, 2005.

LE NOBLE F., FLEURY V., PRIES A., CORVOL P., EICHMANN A. and RENEMAN R. Control of arterial branching morphogenesis in embryogenesis : go with the flow. *Cardiovasc. Res.* 65 : 619-628, 2005.

EICHMANN A., YUAN L., MOYON D., LE NOBLE F., PARDANAUD L. and BREANT C. Vascular development : from precursor cells to branched arterial and venous networks. *Intl. J. Dev. Biol.* 49 : 259-267, 2005.

EICHMANN A., LE NOBLE F., AUTIERO M. and CARMELIET P. Guidance of vascular and neural network formation. *Curr. Opin. Neurobiol.* 15 : 108-115, 2005.

MENETON P., JEUNEMAITRE X., DE WARDENER H.E. and MACGREGOR G.A. Link between dietary salt intake and blood pressure : epidemiological, clinical and genetics evidences. *Physiol. Rev.* 95 : 685-719, 2005.

MEDEAU V., ASSIE G., ZENARO M.-C., CLAUSER E., PLOUIN P.-F. and JEUNEMAITRE X. [Familial aspect of primary hyperaldosteronism : analysis of families compatible with primary hyperaldosteronism type 2]. *Ann. Endocrinol. (Paris)* 66 : 240-246, 2005.

AZIZI M., BOUTOUYRIE P., ALHENC-GELAS F., LAURENT S. and JEUNEMAITRE X. [Polymorphism of kallikrein gene and abnormalities of the endothelial function]. *Med. Sci. (Paris)* 21 : 584-585, 2005. French.

EXPOSÉS, CONGRÈS, ENSEIGNEMENTS

Monsieur le Pr Pierre Corvol a participé aux congrès et séminaires suivants :

2004 : Conférence plénière IFR71 (Janvier 2004) ; Conférence Société d'Hypertension Artérielle (Porto, Janvier 2004) ; Conférence Plénière International Society of Hypertension (ISH, Sao Paulo, Février 2004) ; Conférence plénière Japanese Society of Pharmacology (Osaka, Japon, Mars 2004) ; Conférence Société Belge de Cardiologie (Liège, Mars 2004) ; Conférence de l'Académie de Médecine (Paris, Avril 2004) ; Conférence Institut Paul Hamel (Monaco, Juin 2004).

2005 : Conférence Symposium — Berlin (Février 2005) ; Conférence Réseau ECRIN (CIC) Bruxelles (Février 2005) ; Conférence IFR58 — Paris (Février 2005) ; Conférence à Greifswald — Allemagne (Mars 2005) ; Conférence Journée

de Pneumologie de l'Hôpital Cochin (Avril 2005) ; Conférence IUPS — San Diego (USA) (Avril 2005) ; Conférence University of Tsinghua — Pékin (Avril 2005) ; Conférence plénière — Symposium vasoactive mediators — Lund — Suède (Mai 2005).

La Chaire de Médecine Expérimentale a accueilli en Juin 2005 le Hiroshi IWAO (Departments of Pharmacology, Osaka City University Graduate School of Medicine, Osaka, Japan) pour une série de 4 cours.