

Médecine expérimentale

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

L'Apéline

Le cours de la chaire de Médecine expérimentale a porté sur les propriétés d'un nouveau peptide vasoactif, l'apéline. Le cours de l'année précédente avait montré que plusieurs peptides vasoactifs étaient impliqués dans la formation de nouveaux vaisseaux par des mécanismes impliquant l'angiogenèse et le remodelage vasculaire. Ainsi, l'angiotensine et l'endothéline contrôlent non seulement le tonus vasculaire et régulent le flux sanguin régional mais ont aussi un effet proangiogénique et exercent un rôle dans la croissance de la paroi vasculaire. D'autres peptides vasoactifs exercent une propriété similaire, telle que l'apéline.

La découverte de l'apéline illustre bien la démarche actuelle de l'identification de certaines nouvelles molécules naturelles biologiques. En effet, c'est par une démarche de « pharmacologie inverse » qu'a été identifiée l'apéline comme le ligand d'un récepteur jusque là orphelin, l'APJ. Le récepteur APJ a été cloné en 1993 lors d'une recherche systématique de récepteurs apparentés au récepteur de l'angiotensine II. Il s'agit d'un récepteur à sept domaines transmembranaires découvert chez l'homme par O'Dowd *et al.* (Gene, 1993). Bien qu'il soit analogue au récepteur de l'angiotensine II, ce récepteur ne lie pas l'angiotensine. Il partage une homologie de structure avec le récepteur CXC des chimiokines (CXCR4) et il agit comme co-récepteur du CD4 pour l'entrée du virus HIV-1 et SIV dans les cellules.

L'isolement et la caractérisation du ligand endogène du récepteur APJ humain ont été réalisés par l'équipe de Tatemoto *et al.* (BBRC, 1998). En utilisant une lignée de culture cellulaire exprimant le récepteur APJ, et en suivant son activation par la mesure de l'acidification extracellulaire, ces auteurs ont découvert qu'un peptide présent dans l'estomac de bœuf stimulait l'APJ. La purification, le séquençage et le clonage des fractions peptidiques actives a révélé qu'il existait trois peptides actifs de 36, 17 et 13 acides aminés, issus d'un précurseur commun, la pré-proapéline. La

pré-proapéline (77 acides aminés) est convertie en apéline 36 puis en apéline 17 et 13. Le processus de maturation de la pré-proapéline en apéline 36 n'est pas connu ; la conversion de l'apéline 36 en apélines 17 et 13 est effectuée vraisemblablement par des proconvertases. L'apéline sous ses différentes formes, 36, 17 et 13, est présente dans les tissus, le plasma et divers liquides biologiques. L'apéline 17 est prédominante dans le plasma chez l'homme. Son origine tissulaire n'est pas connue avec précision (hypophysaire, cardiaque, tissu adipeux, autres, ?...). Le catabolisme de ces peptides, leur demi-vie et leur clairance ont peu été étudiés. L'angiotensin-converting enzyme 2 (ACE-2) hydrolyse avec une bonne efficacité catalytique l'apéline 13 en apéline 12 qui conserve une activité biologique.

Les apélines 36, 17 et 13 ont une affinité similaire pour le récepteur APJ. Le récepteur est couplé de façon négative à l'adénylyl cyclase par une protéine Gi. Différentes voies de signalisation intracellulaire sont activées par le récepteur APJ, selon le tissu concerné : phosphorylation de Akt, activation de la p70 S6 kinase, impliquée dans la progression du cycle cellulaire, activation de la phospholipase C et des protéines kinases C par la voie Gq. *In vitro*, les différents fragments d'apéline ont une affinité similaire pour APJ et agissent préférentiellement par la voie Gi1 ou Gi2, mais la désensibilisation du récepteur dépend du type de fragment de l'apéline (L. Messari *et al.*, J. Neurochem., 2004).

L'apéline et son récepteur sont présents principalement dans le cerveau, l'hypophyse, le cœur, le poumon, l'intestin. L'apéline est aussi présente dans le tissu adipeux, au niveau du rein et des surrénales. Cette distribution correspond à des actions chez l'homme qui peuvent être brièvement synthétisées ainsi : au niveau central, l'apéline inhibe la production de vasopressine, module la prise d'eau et de nourriture et stimule la libération d'ACTH. L'apéline exerce un effet cardiaque inotrope positif et abaisse transitoirement et modestement la pression artérielle. L'apéline agit sur les cellules gastriques en stimulant la libération de cholécystokinine ; elle inhibe la sécrétion d'insuline. Elle joue enfin un rôle important dans le développement cardiovasculaire ainsi que l'ont révélé différents travaux.

Deux études ont montré le rôle de l'apéline et de son récepteur dans le développement cardiaque chez le poisson zèbre (Scott *et al.*, Developmental Cell, 2007 et Zeng *et al.*, Developmental Cell, 2007) : dans cette espèce, le système apéline joue un rôle à un stade très précoce, dans la migration des futurs précurseurs myocardiques au cours de la gastrulation. L'inactivation du système à ce stade entraîne des anomalies du développement cardiaque. En revanche, on n'observe pas d'anomalies de l'angiogenèse primaire. Chez la grenouille (Xénope), le récepteur APJ est exprimé dans tous les vaisseaux (en fait, il existe deux isoformes de ce récepteur). L'apéline est exprimée précocément dans les régions intersomitiques avant même que ne se mette en place la formation des veines de cette région. Le système apéline n'est pas impliqué dans la vasculogenèse de cette espèce mais dans l'angiogenèse des vaisseaux intersomitiques : l'inactivation du système perturbe le développement des vaisseaux intersomitiques tandis que la surexpression d'apéline

induit une angiogenèse prématurée des veines intersomitiques. Le récepteur APJ de l'apéline est exprimé dans tous les territoires vasculaires de l'embryon de souris et l'apéline est présente dans les vaisseaux en formation (vaisseaux intersomitiques, bourgeons de membres) (Kalin *et al.*, Dev. Biol. 2007). L'apéline et son récepteur sont exprimés dans les vaisseaux rétiniens en post-natal, au front des branches de division des capillaires en formation (tip cells) (Saint-Geniez *et al.*, Gene Expression Pattern, 2003). En définitive, chez le poisson zèbre, le xénope et la souris, on note une expression temporelle quasi simultanée de l'apéline et de son récepteur, une co-expression spatiale de ces deux molécules. L'apéline est exprimée dans les tip cells et les veines mais elle n'est pas impliquée dans la vasculogenèse. Ses effets s'exercent de façon autocrine et paracrine et sont indépendants du VEGF.

Le système apéline – récepteur APJ joue un rôle *in vitro* et *in vivo* dans l'angiogenèse. L'apéline est un agent angiogénique *in vitro* : elle a un effet mitogénique sur les cellules endothéliales (HUVEC) et un effet chimiotactique. Elle augmente la perméabilité des cellules endothéliales, induit la formation de tubes pseudocapillaires en matrigel et elle participe au remodelage vasculaire au niveau des cellules musculaires lisses vasculaires. L'apéline accroît le bourgeonnement de capillaires à partir d'explants aortiques et provoque une néoangiogenèse dans le modèle de la membrane chorioallantoïdienne de poulet. Enfin, elle favorise l'angiogenèse dans la cornée avasculaire, la formation de capillaires chez l'animal lorsqu'elle est implantée en sous-cutanée, elle contrôle la perméabilité capillaire et est angiogénique dans le modèle de la patte ischémique chez le rongeur. Son effet dans l'angiogenèse tumorale reste encore à préciser, même s'il semble que l'apéline soit exprimée dans les tumeurs (Sorli *et al.*, Oncogène 2007). Le mécanisme d'action de l'apéline est complexe et pourrait impliquer l'angiopoïétine 1 et son récepteur Tie2. L'angiopoïétine induit l'expression d'apéline dans les vaisseaux dermiques de souris transgéniques surexprimant l'angiopoïétine 1 dans le derme. L'apéline pourrait contrôler l'assemblage des cellules endothéliales et leur jonction intercellulaire par l'intermédiaire de protéines d'adhésion intercellulaires telles que VE-cadhérine et Claudin-5. Selon un travail récent (Kidoya *et al.* EMBO J., 2008), le système apéline serait impliqué dans la régulation du calibre vasculaire durant l'angiogenèse : le calibre des vaisseaux sanguins (notamment des vaisseaux dermiques et trachéaux) est réduit chez les souris dont le gène de l'apéline a été inactivé.

Le rôle physiologique du système apéline a été étudié chez des souris adultes dont le récepteur de l'apéline ou le gène de l'apéline a été inactivé par knock-out. Ishida *et al.* (J. Biol. Chem., 2004) ont montré que l'inactivation du récepteur de l'apéline n'entraînait pas d'anomalie macroscopique des organes étudiés chez la souris adulte (vaisseaux, cœur, poumon, reins). La pression basale de ces animaux est normale mais les animaux APJ *-/-* ont une réponse pressive accrue à la perfusion d'angiotensine II, suggérant que l'apéline s'oppose à l'action vasopressive de l'angiotensine II. Cette observation est à rapprocher de celle de l'effet hypotenseur modeste et transitoire de l'administration d'apéline par voie systémique. Deux autres expériences plaident en faveur d'une contre-régulation de l'effet hypertenseur

de l'angiotensine par le système apéline : en l'absence d'angiotensine II endogène (traitement par un inhibiteur de l'enzyme de conversion) ou en cas d'inactivation du récepteur de l'angiotensine II (animaux knock-out pour le récepteur AT₁), la perfusion d'angiotensine II entraîne une élévation de la pression artérielle plus importante chez les animaux dépourvus du récepteur APJ.

L'effet hypotenseur de l'apéline est médié par le monoxyde d'azote, NO. L'apéline se comporte comme un vasodilatateur artériel et veineux dont l'effet dépend de la production de NO par l'endothélium. L'apéline est exprimée au niveau de l'endothélium des artères coronaires, et l'apéline et son récepteur sont aussi présents dans les cellules musculaires lisses de ces artères. L'apéline est exprimée dans les oreillettes ainsi qu'à un niveau plus faible son récepteur (Kleinz *et al.*, Regul. Peptides, 2004). L'apéline produite par les cellules endothéliales agit de façon autocrine en stimulant le récepteur APJ endothélial qui induit la production de monoxyde d'azote, ce qui entraîne à son tour la vasodilatation. L'apéline agit également de façon paracrine sur les cellules musculaires lisses vasculaires sous-jacentes de la paroi vasculaire. L'interaction avec le récepteur APJ entraîne alors une vasoconstriction. *In vivo*, l'apéline a une action tout à fait originale et intéressante car elle entraîne à la fois une réduction de la précharge ventriculaire gauche et de la postcharge *via* une dilatation artérielle et veineuse. L'apéline exerce une action inotrope positive puissante directe *in vitro* et *in vivo*. Elle augmente la contractilité myocardique, ainsi que le débit cardiaque et la réserve contractile sans qu'il y ait toutefois de développement d'une hypertrophie cardiaque. Cette action inotrope positive s'observe sur le cœur sain et lors de l'insuffisance cardiaque (Hashley *et al.*, Cardiovasc. Res. 2005).

Les mécanismes intracellulaires de l'effet inotrope positif de l'apéline pourraient impliquer plusieurs effecteurs : l'augmentation de la sensibilité des cardiomyocytes au calcium intracellulaire, l'activation de l'échangeur sodium-proton via PLC et PKC et l'activation indirecte de l'échangeur Na⁺/Ca⁺⁺ *via* l'activation de Na⁺/H⁺. Il n'existe pas d'anomalie cardiovasculaire apparente peu après la naissance chez la souris dont le gène de l'apéline a été inactivé dans l'étude rapportée par Kuba *et al.* (Circ. Res. 2007). Toutefois, à six mois, on observe un développement progressif d'une altération de la fonction contractile cardiaque à type de dysfonction systolique, sans anomalie histologique cardiaque patente. Ces anomalies peuvent être corrigées par la perfusion d'apéline 1-13 chez l'animal pendant 2 semaines. De même, une insuffisance cardiaque s'observe chez la souris dont le gène de l'apéline a été inactivé lorsque l'on crée une surcharge de pression (bandage aortique), sans que l'on observe toutefois de modification de type hypertrophie cardiaque. L'apéline joue donc probablement un rôle dans l'adaptation de la contractilité cardiaque au cours du vieillissement et en cas de surcharge de pression. Ainsi, on peut faire l'hypothèse qu'une élévation compensatrice de l'apéline aurait lieu dans un premier temps lors de l'insuffisance cardiaque par surcharge de pression, suivie d'une baisse secondaire du peptide qui pourrait contribuer au développement de l'insuffisance cardiaque. Il pourrait en être de même chez l'homme. Une étude du transcriptome du ventricule

gauche avant et après assistance circulatoire chez des patients en insuffisance cardiaque terminale a montré que le gène de l'apéline s'élève de façon marquée après transplantation cardiaque ou après assistance circulatoire (Chang *et al.*, *Circulation* 2003), au moment où la fonction cardiaque a été améliorée.

L'apéline pourrait constituer une piste thérapeutique intéressante en pathologie cardiovasculaire car elle accroît la contractilité cardiaque en réduisant simultanément la pré- et de la post-charge ventriculaire. Ses effets inotropes positifs sont préservés au cours de l'insuffisance cardiaque congestive expérimentale, elle a un effet cardioprotecteur lors de la souffrance myocardique aiguë et chronique et son administration n'entraîne pas d'hypertrophie cardiaque. Il serait donc intéressant d'étudier les effets régionaux et globaux de la perfusion de différents fragments d'apéline chez l'homme, travail qui n'a pas été réalisé à ce jour. De même, il apparaît utile de mesurer avec précision les taux d'apéline plasmatiques au cours de l'insuffisance cardiaque. Les premiers travaux montreraient une élévation de l'apéline plasmatique durant les premiers stades de l'insuffisance cardiaque puis une baisse au cours de l'insuffisance cardiaque décompensée. Toutefois, les résultats publiés jusqu'à présent sont dans l'ensemble difficiles à interpréter du fait de la difficulté du dosage, de l'hétérogénéité des patients en insuffisance cardiaque et de la nécessité de tenir compte des autres facteurs qui peuvent être impliqués dans les variations des taux d'apéline plasmatiques, telle que l'osmolalité plasmatique.

L'apéline est abondante dans l'hypophyse et l'hypothalamus et est co-exprimée avec l'arginine vasopressine (AVP) dans les corps cellulaires du noyau supraoptique. Il existe une interaction entre système apélinergique et vasopressinergique : l'activité électrique phasique des neurones AVP est diminuée par l'administration d'apéline par voie intracérébroventriculaire (De Mota *et al.*, *PNAS* 2004). Ceci suggère que l'apéline pourrait être régulée de façon inverse à l'AVP par l'osmolalité. L'AVP s'élève au cours de l'hyperosmolalité et négative la clairance de l'eau libre. L'apéline pourrait s'abaisser en cas d'hyperosmolalité. Les premiers travaux ont montré qu'effectivement la déshydratation induit des variations inverses des taux d'apéline et d'AVP dans le plasma et l'hypothalamus chez le rat (De Mota *et al.*, *PNAS* 2004). Un travail effectué chez l'homme sain a précisé les relations entre l'osmolalité plasmatique, l'apéline et l'AVP plasmatique. L'étude a été réalisée dans des conditions physiologiques, au cours d'une perfusion de serum salé hypertonique et au cours d'une charge aqueuse afin de provoquer respectivement un état d'hyper- et d'hypo-osmolalité plasmatique. Cette étude a montré pour la première fois que l'apéline était régulée par un stimulus osmolaire chez l'homme : l'hyperosmolalité induite par le serum salé hypertonique provoque une élévation du taux d'AVP et un abaissement du taux d'apéline. Toutefois, la volémie intervient aussi dans la régulation de l'apéline plasmatique. L'élévation de plus de 10 % du volume plasmatique entraîne une augmentation du taux d'apéline (Azizi *et al.*, *JASN* 2008). L'apéline est donc régulée à la fois par des barorécepteurs et des volorécepteurs, de façon indépendante de l'AVP. Ces résultats sont à rapprocher de ceux obtenus chez l'animal qui montrent que l'apéline joue un rôle dans l'homéostasie des volumes

sanguins au niveau central et rénal. Ils amènent à se poser de nouvelles questions : quel peut-être le rôle physiologique de l'élévation de l'apéline plasmatique et sa contribution à la diurèse ? ; quel est le mécanisme d'action de cet effet (effet anti-AVP, possible effet intrarénal) ? ; quel pourrait être l'intérêt d'une classification des états d'hypo-osmolalité avec anomalie de concentration — dilution des urines par la mesure des taux d'apéline plasmatique ? quel serait l'intérêt de développer des agonistes ou des antagonistes de l'apéline sur le plan thérapeutique ?

L'apéline doit être aussi considérée comme une adipokine. L'apéline est exprimée dans l'estomac et stimule la sécrétion de cholécystokinine *in vitro* dans une lignée de cellules murines entéro-endocrine (Wang *et al.*, Endocrinology, 2004). Toutefois, il n'est pas certain que l'apéline passe dans la lumière intestinale et qu'elle exerce des effets au niveau central. L'apéline est exprimée au niveau du tissu adipeux et dans le stroma vasculaire. Son expression s'accroît durant la différenciation des pré-adipocytes en adipocytes (Boucher *et al.*, Endocrinology 2005). Les variations des taux plasmatiques d'apéline sont parallèles à ceux de l'insulinémie : chez la souris, l'apéline du tissu adipeux s'abaisse au cours du jeûne et s'élève durant la reprise alimentaire, de façon similaire à l'insuline. Les taux d'apéline plasmatique et dans le tissu adipeux et le plasma sont associés à un état d'obésité avec hyperinsulinémie chez la souris. *In vitro*, ainsi qu'*in vivo*, l'apéline pourrait participer à la régulation de la sécrétion et/ou de la production d'insuline (Winzell *et al.*, Regul. Peptides 2005). L'apéline, à dose pharmacologique, régule le métabolisme lipidique et l'adiposité chez la souris normale et obèse, sans effet apparent sur la prise de nourriture. Elle abaisse le taux d'insuline et les triglycérides plasmatiques, stimule les protéines découplantes et augmente la dépense énergétique (Higuchi *et al.*, Endocrinology 2007). En accord avec ces données chez l'animal, une élévation des taux d'apéline chez les patients obèses avec hyperinsulinisme a été constatée chez l'homme (Boucher *et al.*, Endocrinology 2005). L'élévation de l'apéline pourrait être une réponse adaptative aux anomalies liées à l'obésité ou encore être corrélée à l'augmentation de la masse adipocytaire.

Ce cours a tenté de faire le point sur le système apélinergique, un nouveau système impliqué dans différentes fonctions : cardiovasculaire, métabolisme énergétique et hydrominéral, etc. L'apéline joue un rôle dans le développement cardiovasculaire chez le poisson zèbre, le Xénope. Elle exerce des effets bénéfiques sur la fonction cardiovasculaire (effet inotrope positif avec action vasodilatatrice dans les territoires artériel et veineux). Elle s'oppose à l'action de la vasopressine et de l'angiotensine II. Par ailleurs, l'apéline est élevée au cours de l'insuffisance cardiaque et de l'obésité chez l'homme. Il reste à savoir si cette augmentation correspond à un rôle causal direct ou indirect de l'apéline dans le mécanisme de ces affections. Actuellement, la recherche sur l'apéline souffre du manque d'agonistes et d'antagonistes peptidiques ou, mieux encore, non peptidiques de cette molécule. Peu de choses sont connues sur l'origine de l'apéline plasmatique, sur ses mécanismes de dégradation et d'élimination. Les connaissances sur les fragments spécifiques de l'apéline (apéline 36, 17, 13) sont rudimentaires. Des inhibiteurs de la dégradation

de l'apéline pourraient permettre de potentialiser les différents peptides et d'élucider leurs effets en physiopathologie.

En résumé, l'apéline est un peptide à effet pléiotropique, comme l'angiotensine II dont elle semble contrecarrer certains des effets. Ce système découvert il y a quelques dix ans, apparaît promoteur tant sur une vue intégrée de la fonction cardiovasculaire que sur les possibles applications en thérapeutique.

RAPPORT D'ACTIVITÉ DU LABORATOIRE

I — Contrôle moléculaire du développement vasculaire

Équipe : A. EICHMANN, L. PARDANAUD, F. LEBRIN, C. FREITAS, S. SUTCHING, E. JONES, B. LARRIVÉE, R. DEL-TORO ESTEVEZ, I. BRUNET, Y. XU, K. BOUVRÉE, T. MATHIVET, A. JABOUILLE, C. BRÉANT, L. PIBOUIN

1. Discrimination entre défauts génétiques et hémodynamiques chez des mutants du récepteur de la neuropiline-1

La délétion de gènes importants pour le développement vasculaire provoque souvent des anomalies du flux sanguin. Puisque les forces hémodynamiques sont importantes dans l'acquisition de la forme des vaisseaux, la présence de défauts dans le flux sanguin empêche souvent la mise en évidence précise du rôle du produit du gène muté. Nous avons développé un système simple pour distinguer les défauts du flux sanguin de ceux dus à la perte de fonction du récepteur de la neuropiline-1 chez la souris (Jones E. *et al.*, Development, 2008). Notre analyse d'embryons de souris homozygotes pour une délétion de ce récepteur a montré que des défauts dans le remodelage du système vasculaire du sac vitellin apparaissent au moment de la mise en place du flux sanguin. Pour distinguer les défauts induits par la perte de fonction de la Neuropiline-1 de ceux secondaires à une perfusion anormale, nous avons cultivés les embryons *ex utero* en absence de flux sanguin. Ces embryons '*no flow*' ont été créés en pratiquant une incision au niveau du cœur qui empêche la circulation embryonnaire. Les embryons peuvent survivre jusqu'à 24 heures dans une chambre rotative et leur réseau vasculaire est analysé par marquage immunohistochimique. Nous avons observé que les défauts du développement du réseau vasculaire chez les embryons neuropiline-1 KO se développaient en absence de flux sanguin. De plus, l'injection d'un anticorps bloquant la liaison du VEGF à la neuropiline-1 dans des embryons sauvages reproduisait les anomalies du développement vasculaire. Une analyse de la migration des cellules endothéliales a montré que les cellules des embryons knockout étaient incapables de migrer à travers la matrice extracellulaire mais restaient piégées dans les vaisseaux déjà formés, formant ainsi des vaisseaux anormalement élargis et dépourvus de points de branchement.

Ces données montrent que les défauts du développement vasculaire chez les embryons neuropiline-1 knockout sont causés par la perte de fonction du récepteur et ne sont pas secondaires à une perfusion vasculaire anormale. Ce système relativement simple peut être appliqué aux nombreux mutants chez lesquels des défauts hémodynamiques sont suspectés.

2. Contrôle moléculaire du guidage des capillaires : sélection des 'tip cells'

L'angiogenèse par bourgeonnement procède de manière analogue à la morphogenèse des tubes épithéliaux de la trachée chez la *Drosophile*. Pendant ce processus, des cellules uniques sont sélectionnées pour former le 'tip' (l'extrémité) d'un bourgeon ; ces cellules répondent au facteur FGF (branchless) par une extension des filopodes et prennent la tête du bourgeon croissant. Les cellules situées en arrière suivent, mais ne deviennent pas 'tip'. Ni les tip cells, ni les autres cellules ne sont pré-spécifiées, mais il y a une compétition entre plusieurs cellules afin que celles présentant le plus fort taux d'activité du récepteur FGF prennent la tête, alors que celles ayant une activité moindre prennent la suite. Cette compétition implique une inhibition latérale médiée par Notch qui empêche des cellules surnuméraires de prendre la tête du bourgeon (Ghabrial & Krasnow, 2006, *Nature* **441** : 746-9).

La sélection des 'tip cells' dans le système vasculaire est sous contrôle de voies de signalisation similaires. Les cellules tip à la tête des capillaires en bourgeonnement sont induites par la mise en jeu du VEGF *via* son récepteur VEGFR2 (Gerhardt *et al.*, 2003, *J Cell Biol* **161** : 1163-77). Les cellules tip expriment aussi des taux importants de Delta-like 4 (Dll4), un ligand de Notch. L'expression de Dll4 est en aval de la signalisation du VEGF, puisque le blocage de cette signalisation par un bloqueur du VEGF, le VEGFR soluble, diminue l'expression de DLL4 dans les tip cells. L'inactivation génique d'un allèle de *dll4* chez la souris provoque une formation excessive de tip cells dans le réseau capillaire de la rétine (Suchting S. *et al.*, PNAS 2007 ; Suchting S. *et al.*, Med. Sci. 2007). Un phénotype similaire est obtenu après inactivation pharmacologique de Notch au moyen d'inhibiteurs des γ -sécrétases ou après la délétion endothélial-spécifique inducible du récepteur Notch-1 (Hellström *et al.*, 2007, *Nature* **445** : 776-80). L'inactivation de *dll4* s'accompagne d'un changement du taux d'expression des récepteurs du VEGF (Tammela T. *et al.*, Nature 2008), indiquant que DLL4 régule négativement la réponse des cellules endothéliales au VEGF et agit comme un frein de cette signalisation, contrôlant ainsi la formation d'un nombre limité de tip cells.

3. Facteurs de guidage des axones dans le système vasculaire

Le bourgeonnement des capillaires partage des similarités avec celle du guidage axonal. Comme les tip cells situées en tête des capillaires, les cônes de croissances situés à l'extrémité de l'axone étendent de nombreux filopodes qui répondent aux facteurs de guidage présentes dans l'environnement, y compris les Nétrines. Parmi les récepteurs des facteurs de guidage axonal, plusieurs ont une expression restreinte

aux vaisseaux sanguins. Au cours de l'évolution et de la diversification de ces familles, l'expression d'un certain nombre de récepteurs a donc été annexée par le système vasculaire. Parmi les récepteurs de la Nétrine-1, UNC5B est exprimé sélectivement dans les cellules endothéliales, y compris dans les tip cells. Des études de perte de fonction par délétion des gènes codant pour ces récepteurs chez la souris montrent que leur fonction de récepteur de guidage est conservée dans leur nouvel environnement tissulaire : les souris déficientes en *unc5b* ont une arborisation vasculaire aberrante aussi bien pendant la vie embryonnaire que pendant la néovascularisation induite expérimentalement chez l'adulte (Larrivée B. *et al.*, Gene & Dev. 2007). La possibilité de diriger la croissance vasculaire pourrait avoir des implications thérapeutiques importantes. En effet, le traitement par la Nétrine-1 empêche la progression de 'tip' capillaires exprimant *unc5b* lors de la néovascularisation tumorale chez la souris (Larrivée B. *et al.*, Gene & Dev. 2007). L'expression vasculaire d'*unc5b* est conservé au cours de l'évolution chez la souris et le poulet (Bouvrée K. *et al.*, Dev. Biol. 2008) et son rôle comme récepteur de guidage répulsif empêchant une vascularisation excessive semble aussi conservé (Bouvrée K. *et al.*, Dev. Biol. 2008 ; Freitas C. *et al.*, Angiogenesis 2008 ; Suchting S. *et al.*, Novartis Fund. Symp. 2008).

II — Hypoxie, angiogénèse : protéines matricielles en pathologie cardiovasculaire et tumorale

Équipe : S. GERMAIN, C. MONNOT, L. MULLER, A. BARRET,
C. ARDIDIE-ROBOUANT, J. PHILIPPE, E. ETIENNE, E. GOMEZ, A. CAZES,
A. GALAUP, N. BRÉCHOT, J. VERINE, C. CHOMEL, M. BIGNON, S. GAUVRIT,
M. DURAND

Moduler l'angiogénèse, la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux préexistants, est une approche thérapeutique prometteuse dans de nombreuses situations pathophysiologiques, notamment dans les cancers et les ischémies cardiovasculaires. L'hypoxie est un stimulus majeur de l'angiogénèse. Le but de notre équipe est i) la recherche de nouveaux gènes par deux approches complémentaires, transcriptomique et protéomique et ii) l'étude de leur rôle au cours de l'hypoxie cellulaire ou tissulaire ainsi que dans la régulation des différentes étapes de l'angiogénèse réactionnelle.

Cette étude a été initiée par le criblage différentiel des ARNm (cDNA RDA) de cellules endothéliales soumises à un stress hypoxique par rapport aux mêmes cellules cultivées en condition témoin (normoxie). Trois cent gènes dont l'expression est induite par l'hypoxie ont été identifiés. Les résultats de ce criblage ont été vérifiés par des approches complémentaires telles que l'hybridation de puces cDNA, sur lesquelles ont été immobilisés les cDNAs issus du criblage (en collaboration avec l'INSERM U533). L'analyse statistique des puces nous a permis de vérifier de façon globale l'induction par l'hypoxie d'une majorité de gènes issus du criblage et d'identifier des gènes dont les rôles dans les mécanismes de régulation de l'angiogénèse par l'hypoxie ne sont pas caractérisés : l'IGF-Binding Protein 3, la

neuritine et la Thioredoxin-interacting protein. L'hybridation *in situ* nous a permis de caractériser l'expression de ces gènes apportant ainsi la preuve de la validité du criblage et la pertinence de certains marqueurs dans les tissus hypoxiques et angiogéniques (Le Jan, 2006).

Afin d'étudier la fonction de certains de ces gènes, les critères de choix suivants ont été appliqués : 1) constituent-ils des marqueurs de pathologies (ischémie des membres inférieurs ou cancer) ? 2) Sont-ils des cibles thérapeutiques potentielles (protéines sécrétées ou récepteurs) ? 3) Comment sont-ils susceptibles de moduler la réponse angiogénique ? *tsp1* et *angptl4*, d'une part, étaient les gènes dont l'expression était la plus fortement induite, à la fois après criblage cDNA RDA et analyse de puces cDNA, et d'autre part, présentaient, le profil d'expression le plus convainquant sur des pièces d'amputation de patients souffrant d'ischémie critique des membres inférieurs ainsi que dans les pathologies tumorales (Le Jan, 2003). Nos efforts se sont donc concentrés sur l'étude de la fonction d'Angiopoietin-like 4 (ANGPTL4) et de la thrombospondine-1 (TSP1).

ANGPTL4 appartient à la famille des angiopoïétines, protéines impliquées dans la maturation et la stabilisation des vaisseaux ainsi que dans le développement du système. Nous avons montré que l'expression de ce gène est induite par l'hypoxie dans les cellules endothéliales. L'ARNm d'ANGPTL4 est aussi exprimé spécifiquement dans les cellules tumorales des cancers conventionnels du rein (ou à cellules claires) pour lesquels ce gène constitue un marqueur diagnostique (Le Jan, 2003). Puis, nous avons montré qu'ANGPTL4 est une protéine sécrétée dans les cultures primaires de cellules endothéliales humaines issues de macro- ou de microvaisseau et soumises à l'hypoxie. Elle est présente sous deux formes distinctes : 1-ANGPTL4 soluble, présente dans le milieu de culture et soumise à une protéolyse extracellulaire (forme longue de 55 kDa et protéolysée de 35 kDa) 2-ANGPTL4 matricielle, associée à la matrice extracellulaire subendothéliale et non protéolysée (55 kDa). Cette forme matricielle interagit très fortement avec la matrice extracellulaire, en particulier par l'intermédiaire des héparanes sulfates protéoglycans. *In vivo*, une accumulation de la forme entière d'ANGPTL4 est observée dans les muscles ischémiques dans un modèle murin d'ischémie de patte (ligature-excision de l'artère fémorale) suggérant qu'ANGPTL4 pourrait exercer un rôle modulateur de l'angiogenèse sur les cellules de la paroi vasculaire dans un contexte hypoxique. Les analyses fonctionnelles réalisées *in vitro* ont confirmé cette hypothèse. L'interaction matricielle d'ANGPTL4 participe à la constitution d'un réservoir de molécules bioactives qui inhibe la migration et l'adhésion des cellules endothéliales, au cours de processus hypoxiques. Ces événements s'accompagnent d'un étalement intermédiaire des HUVEC, associé à une modification du cytosquelette objectivée par une diminution des fibres de stress et des points focaux d'adhésion. Enfin, ANGPTL4 matricielle inhibe le bourgeonnement endothélial et la formation de tubes (Cazes, 2006).

ANGPTL4, étant induit par l'hypoxie et interagissant avec la matrice extracellulaire, pourrait modifier le micro-environnement tumoral et ainsi affecter

les cellules tumorales mais aussi les cellules endothéliales intratumorales. La technique d'électrotransfert d'ADN a été utilisée pour exprimer ANGPTL4 *in vivo* chez la souris. Nous avons montré, en collaboration avec l'UMR 8121 IGR, que les cellules de carcinome pulmonaire 3LL xénogreffées sous la peau de souris et les cellules de mélanome murin B16F0 injectées dans le sinus rétro-orbital, développent moins de métastases pulmonaires chez les souris électrotransférées avec ANGPTL4 que dans les souris contrôle. Les cellules B16 forment des nodules qui restent intravasculaires au niveau pulmonaire, montrant qu'ANGPTL4 inhibe aussi le processus d'extravasation. De plus, ANGPTL4 inhibe la perméabilité vasculaire dans un test de Miles en réponse à l'histamine. *In vitro*, l'expression d'ANGPTL4 par les cellules B16 inhibe leurs propriétés de migration, d'invasion et d'adhésion. Ces phénomènes s'accompagnent d'une désorganisation du cytosquelette d'actine des cellules exprimant ANGPTL4. La formation de points focaux d'adhésion 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 (Galaup, 2006).

Il est maintenant important de déterminer les caractéristiques moléculaires et fonctionnelles de l'interaction d'ANGPTL4 avec la matrice extracellulaire, la modulation de ces interactions pouvant contrôler la biodisponibilité d'ANGPTL4 dans les pathologies ischémiques tumorales comme cardiovasculaires (Chomel, 2008 soumis). Les analyses des cibles moléculaires (récepteurs, intégrines) et cellulaires (cellules de la paroi vasculaire ou cellules tumorales) ainsi que l'étude des souris invalidées pour le gène (*angptl4* KO), disponibles au laboratoire, est en cours.

Dans le cadre d'un réseau INSERM dédié à l'étude des cellules souches, nous étudions le transcriptome ainsi que les propriétés angiogéniques de progéniteurs endothéliaux circulants adultes (Smadja, 2007) et (Smadja, 2008 soumis).

L'objectif de l'équipe est aussi d'analyser les modifications du microenvironnement vasculaire dans un contexte hypoxique, par une analyse des protéines de la matrice extracellulaire produite par les cellules endothéliales *in vitro*. Les processus angiogéniques s'accompagnent d'un profond remodelage matriciel qui consiste aussi bien en la dégradation de la matrice extracellulaire en place qu'en l'établissement d'une matrice provisoire associée aux phénomènes dynamiques de migration cellulaire, puis à la formation d'une lame basale permettant la stabilisation du vaisseau néoformé. Le remodelage matriciel résulte donc à la fois des variations d'expression de gènes et des modifications post-traductionnelles des protéines exprimées. Dans ce contexte, il est important d'analyser le « sous-protéome » matriciel et en particulier l'expression de certains constituants matriciels, notamment des protéines matricielles auxquelles ANGPTL4 est apparentée. Les cellules endothéliales expriment effectivement certains membres de cette famille tels que les CCN (Cyr61, Nov et CTGF), ostéonectine (SPARC) ou la thrombospondine 1 (TSP1) et IGFBP3. Le profil d'expression de Cyr61, Nov, TSP1 et ANGPTL4 a été établi au laboratoire dans le milieu de sécrétion et la MEC de cultures primaires

d'HUVEC (Cazes, 2006). De plus, l'expression de la TSP1 *in vivo* est analysée dans les tissus ischémiques du modèle murin de patte ligaturée. Les conséquences fonctionnelles de cette expression sont en cours dans le modèle de la patte ischémique chez les souris sauvages et les souris invalidées pour le gène (*tsp1* KO) (Bréchet, 2008 soumis).

Parallèlement à cette caractérisation de protéines matricielles candidates, une approche protéomique différentielle, sans a priori, a été réalisée par séparation en électrophorèse bidimensionnelle des protéines de la MEC de cultures primaires de cellules endothéliales de micro- et macrovaisseaux cultivées en normoxie ou hypoxie. Cette approche permet l'analyse de facteurs bioactifs associés aux composants structuraux de la MEC. Ainsi, nous avons identifié par spectrométrie de masse des protéases et des enzymes de pontage et de réticulation de la MEC. Certaines de ces protéines sont accumulées dans la MEC subendothéliale hypoxique, en association avec des réseaux de collagènes et de laminines. L'expression de ces protéines est aussi fortement augmentée dans les tissus ischémiques de pattes de souris ligaturées. Les analyses de ces protéines de pontage de la MEC se poursuivent afin de déterminer leur rôle dans le remodelage matriciel et les réponses angiogéniques des cellules vasculaires.

L'ensemble de ces travaux permettra de caractériser l'action concertée de protéines matricielles régulées par l'hypoxie, contribuant aux modifications du micro-environnement et impliquées dans les processus angiogéniques.

III — Angiogenèse normale et pathologique

Équipe : P. CORVOL, G. NGUYEN, C. HUBERT, J-M. GASC, H. KEMPF, N. LAMANDÉ, A. MICHAUD, I. QUEGUINER, M. CLEMESY, A. BESSONNAT, E. LARGER, S. LEDOUX, F. VINCENT, A. CAILLARD, S. CALDERARI, C. COUSIN, D. BRACQUARD, C. CHOUGNET, M. FYSEKIDIS, M. LEROUX-BERGER, J. SAINZ

L'équipe « Angiogenèse normale et pathologique » s'intéresse à différents sujets de recherche : 1) le rôle du système rénine-angiotensine dans la régulation du système cardiovasculaire et la fonction rénale ; 2) la genèse des calcifications vasculaires et 3) l'angiogenèse du pancréas au cours du développement embryonnaire et son implication éventuelle dans le diabète. Seuls seront brièvement rapportés ici les deux premiers sujets de recherche, le dernier étant encore au stade d'élaboration de programme de recherche.

1. Système rénine-angiotensine

a) Activation constitutive du récepteur de l'angiotensine II

Le rôle du système rénine-angiotensine a été essentiellement étudié par la surexpression ou l'inactivation de ses différents composants chez l'animal. Il n'existait pas jusqu'à présent de données concernant les effets d'une activation constitutive de l'un des gènes de ce système. Le laboratoire avait montré qu'il était possible de créer

une activation constitutive du récepteur AT₁ de l'angiotensine II (AT₁R) *in vitro* en associant une mutation ponctuelle (N111S) et une délétion de l'extrémité C-terminale intra-cytoplasmique. Dans ces conditions, le récepteur AT₁R est spontanément activé, même en l'absence d'angiotensine II, et n'est que partiellement internalisé et désensibilisé (Billet S. *et al.*, J. Clin. Invest. 2007). Afin de connaître les conséquences physiologiques d'une telle activation, un modèle knock-in de souris a été réalisé. Le récepteur constitutivement activé remplace le récepteur AT₁R. Les données *in vivo* sont en accord avec celles observées *in vitro* : la réponse hypertensive et la durée de l'élévation de la pression artérielle sous angiotensine II sont plus marquées que chez les animaux sauvages. Les souris chez qui AT₁R est constitutivement activé développent une discrète hypertension artérielle (+20 mmHg), avec une nette fibrose au niveau cardiaque et rénal. Ceci suggère que la fibrose dans ce cas n'est pas seulement liée à l'élévation de la pression artérielle, somme toute modeste, mais à l'activation locale du système rénine-angiotensine. Les données hormonologiques (rénine plasmatique basse, aldostérone paradoxalement à des valeurs « normales », compte tenu de l'abaissement du taux de rénine) sont similaires à celles observées dans un groupe d'hypertendus catégorisé comme à rénine basse et aldostérone normale. Ce nouveau modèle expérimental s'avère utile pour préciser le rôle de l'angiotensine II dans les organes cibles dans un contexte proche de celui de certaines formes d'hypertension humaine (S. Billet *et al.*, J. Clin. Invest. 2007).

b) Enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE). Rôle du domaine C-terminal et phylogénie

Rôle du domaine C-terminal. L'ACE joue un rôle central dans le système rénine-angiotensine car il convertit l'angiotensine I, inactive, en un octapeptide actif, l'angiotensine II. Par ailleurs, l'ACE inactive la bradykinine, un peptide vasodilatateur et natriurétique. Il existe deux sites, catalytique dans l'ACE, l'un appelé N-terminal et l'autre C-terminal. Ces deux sites N- et C-terminaux catalysent tous deux ces réactions enzymatiques *in vitro* mais leur rôle respectif *in vivo* n'a jamais pu être évalués, faute d'inhibiteurs puissants et sélectifs. En collaboration avec K. Bernstein (Emory Univ., Atlanta, USA), nous avons créé une série de souris génétiquement modifiées pour le gène de l'ACE. Le domaine N-terminal a été inactivé sélectivement et un knock-in réalisé. Aucun phénotype patent n'a été observé, ce qui laissait suggérer que le domaine C-terminal suffisait à assurer l'ensemble des propriétés physiologiques de l'ACE (Fuchs S. *et al.*, J. Biol. Chem. 2004).

Afin de répondre à cette question, des souris chez qui le site catalytique du domaine C-terminal a été inactivé ont été créées (knock-in). De telles souris produisent un ACE dans les tissus somatiques et germinaux comme chez les souris sauvages. Elles ne possèdent qu'un site N-terminal actif. Elles ont une pression artérielle et une fonction rénale apparemment proches de celles des souris sauvages. Toutefois, la régulation de la pression artérielle est maintenue grâce à une stimulation intense de

la production rénale de rénine, ce qui suggère que le domaine N-terminal ne peut compenser par lui seul l'activité du domaine C-terminal. De même, si la fonction rénale apparaît normale en situation physiologique habituelle, les souris dont le domaine C-terminal de l'ACE est inactif ne peuvent pas concentrer de façon satisfaisante leurs urines lorsqu'elles sont soumises à une déshydratation. Ces résultats montrent que le domaine C-terminal est le principal site de clivage *in vivo* de l'angiotensine I. Par ailleurs, les souris dépourvues d'un site catalytique C-terminal actif sont infertiles, ce qui montre le rôle de l'activité enzymatique de l'ACE testiculaire dans la fertilité masculine (S. Fuchs *et al.*, Hypertension 2008).

Présence d'une enzyme de conversion de l'angiotensine active chez une bactérie.

L'ACE est présente dans plusieurs espèces d'invertébrés alors même que ces espèces sont dépourvues des autres constituants du système rénine-angiotensine. L'ACE chez les insectes et la sangsue sont des ACE possédant un seul site catalytique (à l'inverse des vertébrés chez qui existent deux sites catalytiques) et dépourvues d'une pièce hydrophobe d'ancrage transmembranaire. L'ACE pourrait jouer un rôle dans la reproduction chez les insectes.

L'analyse *in silico* de données génomiques révèle qu'une séquence d'ADN pourrait coder pour des enzymes de type ACE. Le clonage d'un tel ACE putatif a été réalisé dans une bactérie phytopathogène, *Xanthomonas axonopodis*, et l'ACE correspondant a été appelé XcACE. L'expression et la caractérisation de cette ACE révèle qu'il s'agit d'une dipeptidyl-carboxypeptidase fonctionnelle. Cette protéine clive l'angiotensine I en angiotensine II, est sensible à l'effet du chore et peut être inhibée par des inhibiteurs d'ACE de mammifère. Ces données montrent que XcACE est une ACE ancestrale, fonctionnelle dont le rôle n'est pas connu. Elle représente un élément de plus pour répondre aux questions sur les relations structure/activité et sur la spécialisation de l'ACE au cours de l'évolution (G. Rivière *et al.*, Genes 2007).

c) *Récepteur de la rénine*

Les études sur les fonctions pléiotropiques du récepteur de la rénine et de la (pro)rénine (P)RR sont poursuivies dans le groupe de G. Nguyen dans plusieurs directions :

— Une étude sur l'expression de (P)RR a été réalisée dans le cerveau de souris adulte. Son rôle possible dans la différenciation neuronale a débuté, en collaboration avec Annette Koulakoff (Inserm U840 Collège de France Paris) et Charles Schwartz (Greenwood Genetic Center, USA). Manuscrit soumis.

— La caractérisation des différentes formes moléculaires de (P)RR et, en particulier, la recherche d'une forme soluble du récepteur. Les travaux se porteront notamment sur l'enzyme responsable du clivage intracellulaire de (P)RR et sur les fonctions du (P)RR soluble.

— Une étude de l'expression de (P)RR dans le rein embryonnaire a été réalisée. En outre, les conséquences de l'exposition du fœtus à un diabète maternel sur les taux de (P)RR seront étudiées. Ce programme est financé par le Conseil régional d'Ile de France sous la forme d'une allocation doctorale de 3 ans.

— Enfin, le laboratoire devrait disposer très bientôt de souris floxées pour (P)RR. Ces souris seront croisées avec des souris Cre sous contrôle de différents promoteurs (podocine spécifique des cellules épithéliales rénales, SM22 spécifiques des cellules musculaires lisses vasculaires), afin d'étudier le rôle de physiologique de (P)RR ainsi que son implication dans différents modèles pathologiques, diabète, hypertension.

2. Bases moléculaires des calcifications vasculaires

Dans les conditions physiologiques, la minéralisation de la matrice extracellulaire (MEC) apparaît exclusivement dans les os (et les dents) qui se forment soit directement par différenciation ostéoblastique soit par l'intermédiaire de cartilage lors d'une différenciation chondro-ostéoblastique. Toutefois, dans certaines conditions pathologiques, une minéralisation ectopique et anormale peut se développer dans des tissus mous, telles que les artères. Cette minéralisation ectopique des vaisseaux, appelée plus couramment calcification vasculaire, est fréquemment observée chez le sujet âgé ou comme complication chez le patient atteint de pathologies, telles que l'athérosclérose, le diabète, l'hypercholestérolémie, ou encore l'insuffisance rénale. Bien que longtemps considérées comme bénignes, il est désormais clairement établi que les calcifications vasculaires sont associées à des événements cardiovasculaires. La minéralisation de la paroi vasculaire est un indicateur important de la morbi-mortalité cardiovasculaire.

Bien que la physiopathologie de ces calcifications/minéralisations vasculaires soit bien documentée, peu de choses sont connues sur les processus moléculaires impliqués dans leur formation et leur développement dans la paroi artérielle. Il apparaît donc évident qu'une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans l'initiation et la progression de cette pathologie est essentielle pour améliorer la prévention et le traitement de ces minéralisations ectopiques. L'essentiel de la littérature suggère que le développement des calcifications vasculaires est due à la différenciation ostéoblastique de cellules musculaires lisses vasculaires en cellules osseuses dont la MEC subit une minéralisation. Cependant, d'autres résultats générés par l'analyse de souris mutées, telles que celles dépourvues de Matrix Gla Protein (Mgp, une protéine γ -carboxylée de la MEC), démontrent que la minéralisation de la paroi artérielle peut être initiée en absence d'ostéoblastes mais en présence de chondroblastes. Ces résultats suggèrent que, lors des calcifications vasculaires, la paroi artérielle peut être le siège, par des mécanismes qu'il reste à découvrir, à la fois d'une différenciation chondroblastique à l'origine de l'apparition de cellules cartilagineuses dans le vaisseau affecté et d'une minéralisation indépendante de la présence d'ostéoblastes de ce même vaisseau.

Pour élucider les mécanismes moléculaires responsables de l'initiation de la minéralisation pathologique des vaisseaux, les buts de notre projet sont: 1) d'étudier les signaux et facteurs de transcription (notamment mais pas exclusivement certains candidats tels que Shh, BMPs et GATA6, Nkx3 .2 respectivement), responsables de la formation de cartilage ectopique dans les artères, grâce à l'analyse de deux modèles d'animaux présentant des calcifications vasculaires importantes ; 2) de déterminer, en culture mais également *in vivo*, les rôles et interactions spécifiques de ces molécules dans la transition phénotypique des cellules musculaires lisses en cellules cartilagineuses ; 3) d'identifier et de caractériser des nouveaux régulateurs impliqués dans la minéralisation indépendante de l'apparition d'ostéoblastes.

Les résultats préliminaires obtenus au cours de ces derniers mois montrent :

— La disparition de marqueurs des cellules musculaires lisses au profit de l'apparition de l'expression de marqueurs de cartilage lors du développement des calcifications vasculaires dans le modèle des souris déficientes en *Mgp*. Ceci confirme l'existence d'une trans-différentiation des cellules musculaires lisses vasculaire en cellules de cartilage au cours des processus de calcification.

— L'existence d'une inhibition de l'activité des facteurs vasculaires par les facteurs chondrogéniques. Inversement les facteurs vasculaires empêchent l'activité transcriptionnelle de facteurs pro-chondrogéniques. Ces résultats suggèrent ainsi que, dans les conditions physiologiques, il existe une modulation réciproque des deux types de facteurs qui maintiennent chaque cellule qui les exprime dans leur phénotype propre. En conditions pathologiques, la surexpression de facteurs pro-chondrogéniques pourrait être responsable de la conversion des cellules musculaires lisses en chondrocytes.

En identifiant les signaux et facteurs de transcription impliqués dans la transition des cellules musculaires lisses vasculaires en chondrocytes, ce programme de recherche fournira des informations nouvelles et déterminantes sur les mécanismes qui régulent les étapes précoces des complications cardiovasculaires. Par conséquent, nous espérons que les résultats obtenus au terme de ce projet pourront ouvrir de nouvelles stratégies thérapeutiques destinées à bloquer très précocement l'apparition et le développement des calcifications chez les sujets à risque.

LISTE DE PUBLICATIONS DU LABORATOIRE 2007-2008

ACHARD V., BOULLU-CIOCCA S., DESBRIERE R., NGUYEN G. and GRINO M. Renin receptor expression in human adipose tissue. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 292 : R274-R282, 2007.

MAGNON C., GALAUP A., ROUFFIAC V., OPOLON P., CONNAULT E., ROSE M., PERRICAUDET M., ROCHE A., GERMAIN S., GRISCELLI F. and LASSAU N. Dynamic assessment of antiangiogenic therapy by monitoring both tumoral vascularization and tissue degeneration. *Gene Ther.* 14 : 108-117, 2007.

SIHN G., WALTER T., KLEIN J.-C., QUEGUINER I., IWAO H., NICOLAU C., LEHN J.-M., CORVOL P. and GASC J.-M. Anti-angiogenic properties of myo-inositol triphosphosphate in ovo and growth reduction of implant. *FEBS Lett.* 581 : 962-966, 2007.

SUCHTING S., FREITAS C., LE NOBLE F., BENEDITO R., BREANT C., DUARTE A. and EICHMANN A. The Notch ligand Delta-like 4 negatively regulates endothelial tip cell formation and vessel branching. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104 : 3225-3230, 2007.

BATENBURG W.W., KROP M., GARRELDI I.M., DE VRIES R., DE BRUIN R.J., MÜLLER D. N., BADER M., NGUYEN G. and DANSER A.H. Prorenin is the endogenous agonist of the (pro)renin receptor. Binding kinetics of renin and prorenin in rat vascular smooth muscle cells overexpressing the human (pro)renin receptor. *J. Hypertens.* 25 : 2441-2453, 2007.

KREBS C., HAMMING I., SADAGHIANI S., STEINMETZ O.M., MEYER-SCHWESINGER C., FEHR S., STAHL R.A., GARRELDI I.M., DANSER A.H., VAN GOOR H., CONTREPAS A., NGUYEN G. and WENZEL U. Antihypertensive therapy upregulates renin and (pro)renin receptor in the clipped kidney of Goldblatt hypertensive rats. *Kidney Int.* 72 : 725-730, 2007.

PADILLA B.E., COTTRELL G.S., ROOSTERMAN D., PIKIOS S., MULLER L., STEINHOFF M. and BUNNETT N.W. Endothelin-converting enzyme-1 regulates endosomal sorting of calcitonin receptor-like receptor and beta-arrestins. *J. Cell. Biol.* 179 : 981-997, 2007.

SMADJA D.M., BIECHE I., HELLEY D., LAURENDEAU I., SIMONIN G., MULLER L., AIACH M. and GAUSSEM P. Increased VEGFR2 expression during human late endothelial progenitor cells expansion enhances in vitro angiogenesis with up-regulation of integrin alpha(6). *J. Cell. Mol. Med.* 11 : 1149-1161, 2007.

ROOSTERMAN D., COTTRELL G.S., PADILLA B.E., MULLER L., ECKMAN C.B., BUNNETT N.W. and STEINHOFF M. Endothelin-converting enzyme 1 degrades neuropeptides in endosomes to control receptor recycling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104 : 11838-11843, 2007.

MAGNON C., OPOLON P., RICARD M., CONNAULT E., ARDOUIN P., GALAUP A., METIVIER D., BIDART J.-M., GERMAIN S., PERRICAUDET M. and SCHLUMBERGER M. Radiation and angiogenesis inhibition synergize to induce HIF-1 α -mediated tumor apoptotic switch. *J. Clin. Invest.* 117 : 1844-1855, 2007.

LARRIVEE B., FREITAS C., TROMBE M., LV X., DELAFARGE B., YUAN L., BOUVREE K., BREANT C., DEL TORO R., BRECHOT N., GERMAIN S., BONO F., DOL F., CLAES F., FISCHER C., AUTIERO M., THOMAS J.L., CARMELIET P., TESSIER-LAVIGNE M. and EICHMANN A. Activation of the UNC5B receptor by Netrin-1 inhibits sprouting angiogenesis. *Genes & Dev.* 21 : 2433-2447, 2007.

BILLET S., BARDIN S., VERP S., BAUDRIE V., MICHAUD A., CONCHON S., MUFFAT-JOLY M., ESCOUBET B., SOUIL E., HAMARD G., BERNSTEIN K.E., GASC J.-M., ELGHOZI J.-L., CORVOL P. and CLAUSER E. Gain-of-function mutant of angiotensin II receptor, type 1A, causes hypertension and cardiovascular fibrosis in mice. *J. Clin. Invest.* 117 : 1914-1925, 2007.

BOBRIE G., POSTEL-VINAY N., DELONCA J., CORVOL P. and SETHI INVESTIGATORS. Self-measurement and self-titration in hypertension: a pilot telemedicine study. *Am. J. Hypertens.* 20 : 1314-1320, 2007.

RIVIERE G., MICHAUD A., CORRADI H.R., STURROCK E.D., RAVI ACHARYA K., COGEG V., BOHIN J.-P., VIEAU D. and CORVOL P. Characterization of the first angiotensin-converting like enzyme in bacteria: Ancestor ACE is already active. *Gene* 399 : 81-90, 2007.

BRAND M., LAMANDE N., LARGER E., CORVOL P. and GASC J.-M. Angiotensinogen impairs angiogenesis in the chick chorioallantoic membrane. *J. Mol. Med.* 85 : 451-460, 2007.

KEMPF H., IONESCU A., UDAGER A.M. and LASSAR A.B. Prochondrogenic signals induce a competence for Runx2 to activate hypertrophic chondrocyte gene expression. *Dev. Dyn.* 236 : 1954-1962, 2007.

SUCHTING S., FREITAS C., LE NOBLE F., BENEDITO R., BREANT C., DUARTE A., EICHMANN A. Negative regulators of vessel patterning. *Novartis Found. Symp.* 283 : 77-80, 2007.

ZINGG-SCHENK A., BACCHETTA J., CORVOL P., MICHAUD A., STALLMACH T., COCHAT P., GRIBOUVAL O., GUBLER M.-C. and NEUHAUS T.J. Inherited renal tubular dysgenesis: the first patients surviving the neonatal period. *Eur. J. Pediatr.* 167 : 311-316, 2008.

SLUIMER J., GASC J.-M., HAMMING I., VAN GOOR H., MICHAUD A., VAN DEN AKKER L., JÜTTEN B., CLEUTJENS J., BIJNENS A., CORVOL P., DAEMEN M. and HEENEMAN S. Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) expression and activity in human carotid atherosclerotic lesions. *J. Pathol.* 215 : 273-279, 2008.

FELDMAN D.L., JIN L., XUAN H., CONTREPAS A., ZHOU Y., WEBB R.L., MUELLER D.N., FELDT S., CUMIN F., MANIARA W., PERSOHN E., SCHUETZ H., JAN DANSER A.H. and NGUYEN G. Effects of Aliskiren on blood pressure, albuminuria, and (pro)renin receptor expression in diabetic TG(mREN-2)27 rats. *Hypertension* 52 : 130-136, 2008.

FELDT S., BATENBURG W.W., MAZAK I., MASCHKE U., WELLMER M., KVAKAN H., DECHEND R., FIEBELER A., BURCKLE C., CONTREPAS A., JAN DANSER A.H., BADER M., NGUYEN G., LUFT F.C. and MULLER D.N. Prorenin and renin-induced extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation in monocytes is not blocked by aliskiren or the handle-region peptide. *Hypertension* 51 : 682-688, 2008.

BATENBURG W.W., DE BRUIN R.J., VAN GOOL J.M., MÜLLER D.N., BADER M., NGUYEN G. and DANSER A.H. Aliskiren-binding increases the half life of renin and prorenin in rat aortic vascular smooth muscle cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 28 : 1151-1157, 2008.

SLUIMER J.C., GASC J.-M., VAN WANROIJ J.L., KISTERS N., GROENEWEG M., SOLLEWIJN GELPKE M.D., CLEUTJENS J.P., VAN DEN AKKER L.H., CORVOL P., WOUTERS B.G., DAEMEN M.J. and BIJNENS A.P. Hypoxia, hypoxia-inducible transcription factor, and macrophages in human atherosclerotic plaques are correlated with intraplaque angiogenesis. *J. Am. Coll. Cardiol.* 51 : 1258-1265, 2008.

HAMMING I., VAN GOOR H., TURNER A.J., RUSHWORTH C.A., MICHAUD A., CORVOL P. and NAVIS G. Differential regulation of renal angiotensin-converting enzyme (ACE) and ACE2 during ACE inhibition and dietary sodium restriction in healthy rats. *Exp. Physiol.* 93 : 631-638, 2008.

FUCHS S., XIAO H.D., HUBERT C., MICHAUD A., CAMPBELL D.J., ADAMS J.W., CAPECCHI M.R., CORVOL P. and BERNSTEIN K.E. Angiotensin-converting enzyme C-terminal catalytic domain is the main site of angiotensin I cleavage in vivo. *Hypertension* 51 : 267-274, 2008.

DAVID L., MALLET C., KERAMIDAS M., LAMANDÉ N., GASC J.-M., DUPUIS-GIROD S., PLAUCHU H., FEIGE J.J. and BAILLY S. Bone morphogenetic protein-9 is a circulating vascular quiescence factor. *Circ. Res.* 102 : 914-922, 2008.

SABAA N., DE FRANCESCHI L., BONNIN P., CASTIER Y., MALPELI G., DEBBABI H., GALAUP A., MAIER-REDELSPERGER M., VANDERMEERSCH S., SCARPA A., JANIN A., LEVY B., GIROT R., BEUZARD Y., LEBOEUF C., HENRI A., GERMAIN S., DUSSAULE J.-C. and THARAUX P.L. Endothelin receptor antagonism prevents hypoxia-induced mortality and morbidity in a mouse model of sickle-cell disease. *J. Clin. Invest.* 118 : 1924-1933, 2008

THAUNAT O., LOUEDEC L., GRAFF-DUBOIS S., DAI J., GROYER E., YACOB-YOUSSEF H., MANDET C., BRUNÉVAL P., KAVERI S., CALIGIURI G., GERMAIN S., MICHEL J.-B. and NICOLETTI A. Antiangiogenic treatment prevents adventitial constrictive remodeling in graft arteriosclerosis. *Transplantation* 85 : 281-289, 2008.

FREITAS C., LARRIVEE B. and EICHMANN A. Netrins and UNC5 receptors in angiogenesis. *Angiogenesis* 11 : 23-29, 2008.

BOUVREE K., LARRIVEE B., LV X., YUAN Y., DELAFARGE B., FREITAS C., MATHIVET T., BREANT C., TESSIER-LAVIGNE M., BIKFALVI A., EICHMANN A. and PARDANAUD L. Netrin-1 inhibits sprouting angiogenesis in developing avian embryos. *Dev. Biol.* 318 : 172-183, 2008.

JONES E.A.V., YUAN L., BRÉANT C., WATTS R.J. and EICHMANN A. Separating genetic and hemodynamic defects in neuropilin-1 knockout embryos. *Development* 135 : 2479-2488, 2008.

Revues, Ouvrages

GALAUP A. and GERMAIN S. Blocking PlGF, a future in anti-angiogenic therapy? *Med Sci (Paris)* 24 : 459-462, 2008.

NGUYEN G. The (pro)renin receptor: pathophysiological roles in cardiovascular and renal pathology. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 16 : 129-133, 2007.

SUCHTING S., FREITAS C. and EICHMANN A. L'angiogenèse passe sous contrôle de Delta-Notch. *Med. Sci. (Paris)* 23 : 347-348, 2007.

NGUYEN G. The (pro)renin receptor: a new kid in town. *Semin. Nephrol.* 27 : 519-523, 2007.

NGUYEN G. and DANSER A.H. Prorenin and (pro)renin receptor: a review of available data from in vitro studies and experimental models in rodents. *Exp. Physiol.* 93 : 557-563, 2008.

CORVOL P., MICHAUD A., GRIBOUVAL O., GASC J.-M. and GUBLER M.-C. Can we live without a functional renin-angiotensin system? *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 35 : 431-433, 2008.

NGUYEN G. and CONTREPAS A. The (pro)renin receptors. *J. Mol. Med.* 86 : 643-646, 2008.

NGUYEN G. and CONTREPAS A. Physiology and pharmacology of the (pro)renin receptor. *Curr. Opin. Pharmacol.* 8 : 127-132, 2008.

LISTE DES DIPLÔMÉS

Thèses

Aurélie Cazes : Thèse de Doctorat d'Université Paris VI,
Spécialité : Physiologie et Physiopathologie
Soutenue le 9 juillet 2007
*Interaction de l'Angiopoietin-like 4 avec le microenvironnement
et modulation des comportements cellulaires en contexte hypoxique tumoral
et vasculaire*