

Médecine expérimentale

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

Angiogenèse et cancer

Au cours de l'année 2005-2006, le cours de la chaire de Médecine expérimentale a porté sur un sujet important et de grande actualité : le développement de nouveaux vaisseaux dans le cancer et une approche thérapeutique nouvelle, l'inhibition de la néoangiogenèse dans les processus cancéreux et métastatiques.

Les cancers ne peuvent se développer que grâce à des vaisseaux apportant l'oxygène et les nutriments dont les cellules cancéreuses, grandes consommatrices de substrats énergétiques, ont besoin pour leur croissance. La prolifération d'une tumeur ne peut se concevoir sans le développement d'une vascularisation appropriée, qu'il s'agisse de détournement de vaisseaux préexistants à son profit ou de la formation *de novo* de vaisseaux tumoraux. De là est née l'hypothèse qu'en détruisant les vaisseaux irriguant la tumeur, on pourrait stopper la croissance des cellules cancéreuses ou, à tout le moins, stabiliser la tumeur. Cette hypothèse, énoncée par J. Folkman¹ dès 1971, a été précédée d'une série d'observations qui suggéraient un lien entre croissance tumorale et développement d'une vascularisation.

La découverte du VEGF, facteur crucial du développement des vaisseaux dans des conditions normales et pathologiques, comme le cancer, a joué un rôle déterminant dans la validation du concept du traitement anti-angiogénique en pathologie tumorale. Les premiers résultats obtenus avec un anticorps bloquant l'action du VEGF dans le cancer du colon avec métastases se sont révélés encourageants et soulèvent de nouvelles questions : Les vaisseaux sanguins des tumeurs sont-ils identiques aux vaisseaux normaux ou, au contraire, ont-ils des marques qui leur sont propres ? comment se développent-ils ? et comment stopper leur formation ? Ne risque-t-on pas de compromettre la circulation dans les tissus normaux à vouloir inhiber la vascularisation tumorale ? Quels sont les résultats obtenus chez l'homme,

1. Folkman J., New Engl. J. Med., 1971.

dans différents types de cancers ? En un mot, l'espoir mis dans la logique de cette nouvelle stratégie thérapeutique est-il justifié ? Le cours de la chaire de Médecine expérimentale a tenté de répondre à certaines de ces questions.

Les vaisseaux normaux : des vaisseaux dormants

Les vaisseaux tumoraux : des vaisseaux actifs

Une fois mis en place, chez l'adulte les vaisseaux sont remarquablement stables. La cellule endothéliale est quiescente et ne se renouvelle que tous les 2 ou 3 ans. Les vaisseaux se divisent et s'accroissent dans des circonstances bien précises : en cas d'ischémie provoquée par une oblitération progressive des vaisseaux ou une thrombose vasculaire responsable d'infarctus, et en cas de tumeur. La cellule endothéliale du capillaire passe alors d'un état dormant à un état actif dit « angiogénique », transition encore appelée « switch angiogénique² ». Elle acquiert des propriétés de jeunesse qu'elle avait mises en sommeil : elle est capable de se diviser, de migrer, d'établir des connections avec les cellules avoisinantes. Elle exprime des facteurs de croissance, des récepteurs de surface, des molécules d'adhésion, des molécules de survie (molécules anti-apoptotiques). Elle synthétise et active des métalloprotéases qui permettent au vaisseau en formation de progresser dans le tissu grâce à la dégradation de la membrane basale qui l'entoure et de la matrice extracellulaire.

Cette « activation angiogénique » de la cellule endothéliale n'est pas spécifique de l'angiogenèse tumorale. Il semble toutefois que la cellule endothéliale activée lors des processus cancéreux pourrait exprimer des gènes qui lui soient tout à fait propres et absents dans les autres états d'angiogenèse³. L'intérêt de telles protéines spécifiques de l'endothélium tumoral est qu'elles représenteraient autant de cibles du vaisseau tumoral.

D'autres mécanismes sont mis en jeu et concourent à la vascularisation des tumeurs. Tout d'abord, la tumeur peut détourner, coopter, recruter à son profit les vaisseaux irriguant normalement le tissu sain avoisinant. Par ailleurs, la néoangiogenèse peut impliquer la participation de cellules souches de la moelle sanguine. Des précurseurs circulants des cellules endothéliales, issues des progéniteurs cellulaires de la moelle osseuse, peuvent être recrutés et participer à l'élaboration de la nouvelle vascularisation. Un réseau lymphatique aux alentours de la tumeur s'établit. Il draine le liquide interstitiel intratumoral mais peut aussi véhiculer les cellules cancéreuses et favoriser leurs dissémination métastatiques. Enfin, des pseudo-vaisseaux peuvent se former dans la tumeur : il s'agit de conduites créées dans le tissu tumoral, bordées de cellules tumorales, et non pas de cellules endothéliales, phénomène appelé pour cette raison « mimétisme vasculaire⁴ ».

2. Bergers G., Nature Reviews Cancer, 2003.

3. St-Croix, Science, 2000.

4. Folberg R. *et al.*, Am. J. Pathol., 2000.

Ainsi constitué, le réseau vasculaire tumoral s'oppose point par point au réseau vasculaire normal. L'arbre vasculaire normal est un réseau organisé, stable. Sa localisation est appropriée. La perméabilité des capillaires est contrôlée et dépend de la structure de l'endothélium propre au tissu. Le flux sanguin du réseau vasculaire normal est régulé. En revanche, le réseau vasculaire tumoral est désorganisé, anarchique, instable. Il existe des lacs vasculaires, des hémorragies et un passage de liquide plasmatique dans le secteur interstitiel du fait d'une perméabilité capillaire accrue. Des shunts artério-veineux s'établissent concourant à un flux sanguin irrégulier, non contrôlé par les agents vaso-actifs. Enfin, la couverture des capillaires par les péricytes est insuffisante. Ces anomalies de structure des vaisseaux tumoraux s'accompagnent d'anomalies fonctionnelles : hétérogénéité des flux sanguin et lymphatique, élévation de la pression interstitielle dans la tumeur du fait de l'accroissement de la perméabilité vasculaire, baisse de la pression partielle d'oxygène et acidose dans la tumeur. Le micro-environnement tumoral est profondément perturbé du fait de cette vascularisation anormale, d'une fibrose interstitielle et d'une contraction de la matrice extracellulaire interstitielle intra-tumorale contribuant à l'élévation de la pression interstitielle. L'hypoxie et l'acidose favorisent la production de facteurs angiogéniques par les cellules tumorales, le développement de néo-vaisseaux et l'accroissement de la tumeur. Ainsi s'établit un cercle vicieux favorisant la progression tumorale.

Le VEGF et le réseau vasculaire tumoral : une connivence bien établie

Le VEGF apparaît comme un coupable parfait pour l'établissement et la propagation d'un réseau vasculaire tumoral : il réveille les cellules endothéliales dormantes, il les active, induit leur prolifération, leur migration, leur survie. Il accroît la perméabilité vasculaire de l'endothélium et agit sur d'autres types cellulaires : il inhibe les cellules dendritiques présentatrices d'antigènes, et amoindrit les défenses immunitaires de l'organisme, il mobilise les macrophages et les cellules progénitrices des cellules endothéliales. L'ensemble favorise la néoangiogenèse et la formation d'un micro-environnement favorable à la croissance des cellules tumorales⁵. L'hypoxie est le principal élément déclenchant la synthèse de VEGF par les cellules tumorales et leur environnement. Au-delà de 100 μm des capillaires, la pression partielle d'oxygène (pO_2) chute notablement et l'acidose s'accroît. La baisse de la pO_2 est perçue dans les cellules qui mettent en jeu un facteur de transcription sensible à l'hypoxie, « hypoxia-inducible factor » (HIF), qui active la transcription d'un certain nombre de gènes tels que le VEGF. Ainsi s'établit une relation étroite entre croissance tumorale, hypoxie, production de VEGF et formation de néo-vaisseaux tumoraux. On estime qu'une tumeur ne peut progresser au-delà de quelques millimètres cubes sans qu'il n'y ait formation de nouveaux vaisseaux : tumeur et vaisseaux dans une tumeur progressent de concert, dépendant l'un de l'autre.

5. Ferrara N. and Kerbel R.S., Nature 438 : 967, 2005.

L'induction du VEGF par l'hypoxie a été montrée peu après la découverte de la présence de VEGF dans le glioblastome, une tumeur cérébrale particulièrement vascularisée : le VEGF se trouve à proximité des zones hypoxiques de nécrose du tissu tumoral et est synthétisé dans les cellules cancéreuses⁶.

Le VEGF agit sur ses cellules cibles par ses deux récepteurs principaux, les VEGF receptors-1 et -2 (VEGFR-1 et -2). Le VEGFR-2 est le récepteur principal et est notamment responsable de la prolifération, de la migration, de la survie des cellules endothéliales et de l'angiogénèse. Le VEGF lié au récepteur R-2 situé à la surface cellulaire déclenche l'activation de l'activité enzymatique tyrosine-kinase de la partie intracellulaire du récepteur. Celle-ci entraîne à son tour une série d'évènements intracellulaires conduisant notamment à la production de monoxyde d'azote, l'expression de molécules d'adhésion à la surface cellulaire (intégrines), et l'activation de métalloprotéases. La fonction du VEGFR-1 est moins bien connue mais il pourrait servir de récepteur de clairance, de capture du VEGF. Une forme soluble de ce récepteur existe et pourrait contrôler le taux de VEGF circulant. Cette propriété est exploitée dans une approche thérapeutique qui consiste à administrer une forme recombinante du VEGFR-1 soluble pour capturer et inactiver ainsi le VEGF.

Stratégies anti-angiogéniques dirigées contre le VEGF

Résultats expérimentaux

Le traitement anti-VEGF s'attaque aux cellules endothéliales activées par le VEGF et ne concerne donc pas l'endothélium normal qui est quiescent. *A priori* — mais ceci reste à prouver sur le long terme chez l'homme — les vaisseaux normaux ne devraient pas être affectés. Les vaisseaux tumoraux sont facilement accessibles par un traitement administré par voie systémique. Ils sont stables sur le plan génétique, à l'inverse des cellules cancéreuses qui sont soumises à de nombreuses mutations. Les agents anti-tumoraux conventionnels et la radiothérapie peuvent agir de façon synergique avec une thérapie anti-angiogénique. L'intérêt d'une telle thérapie est qu'elle pourrait s'appliquer à l'ensemble des vaisseaux tumoraux, quelque soit le type de cancer concerné alors que la chimiothérapie doit être individualisée, en fonction du type de tumeur.

Plusieurs stratégies ont été développées et évaluées dans des modèles de tumeurs expérimentales et sont, pour la plupart, en cours d'essais thérapeutiques chez l'homme. Un anticorps monoclonal anti-VEGF « humanisé », le bevacizumab, bloque les différentes isoformes du VEGF avec une haute affinité. Il doit être administré par voie intraveineuse et la demi-vie de son action se situe autour de 17-21 jours. Une forme soluble humanisée du récepteur R-1 utilise le même principe. Elle a l'avantage d'inactiver à la fois le VEGF et le Placenta Growth Factor (PIGF), un autre facteur de croissance vasculaire, ce que ne fait pas l'anticorps anti-VEGF. Une autre molécule, un aptamère, bloque l'interaction du VEGF avec son récepteur, le

6. Shweiki D. *et al.*, Nature 359 : 843, 1992.

pegaptanib. Des inhibiteurs de l'activité tyrosine-kinase du récepteur du VEGF ont été synthétisés. Certains seraient spécifiques de l'activité tyrosine-kinase du récepteur du VEGF, d'autres inhibent d'autres types de récepteurs tyrosine-kinase de facteur de croissance possiblement impliqués dans la néo-angiogenèse et la croissance tumorales. Avantage supplémentaire ou au contraire inconvénient dû au manque de spécificité de telles molécules, il est encore trop tôt pour le savoir.

L'effet du blocage du VEGF dans la croissance de tumeurs expérimentales a été étudié chez la souris nude⁷. Des lignées de cellules cancéreuses humaines productrices de VEGF ont été greffées chez la souris nude traitée ou non par l'anticorps anti-VEGF. Ce dernier inhibe *in vivo* la croissance tumorale et réduit la densité vasculaire, démontrant pour la première fois l'effet du VEGF sur la vascularisation tumorale et la croissance. Une autre expérience a démontré le rôle du VEGF dans la progression du cancer du colon chez la souris : L'administration d'anti-VEGF inhibe la croissance des tumeurs coliques humaines chez la souris nude ainsi que le développement de métastases hépatiques injectées par voie intrasplénique dans le foie des mêmes souris⁸.

Premiers résultats de la stratégie anti-angiogénique anti-VEGF dans le cancer chez l'homme

Le développement clinique d'inhibiteurs de l'angiogenèse en cancérologie se fait actuellement en associant à un traitement conventionnel (chimiothérapie, radiothérapie) des médicaments anti-angiogéniques. Il n'est pas démontré que donné **isolément**, par lui-même, un traitement anti-angiogénique soit efficace chez l'homme. Pour l'instant, il semble préférable d'associer une thérapeutique cytotoxique à la thérapeutique anti-angiogénique qui, elle, n'est pas cytotoxique mais cytostatique. Plusieurs avantages peuvent être attendus de cette association : action sur des cibles cellulaires différentes avec possible effet additif ou synergistique, absence de résistance croisée aux médicaments, absence d'effets secondaires des cytostatiques sur l'hématopoïèse. Le premier essai prometteur a été réalisé dans le cancer du rein avec métastases. En comparant un traitement standard associé à un placebo vis-à-vis du même traitement anti-cancéreux standard associé au bévacizumab, une amélioration de la survie sans progression du cancer a été observée⁹.

Un autre essai thérapeutique a eu pour but l'étude de la survie globale de patients porteurs d'un cancer du colon métastasé. Deux groupes de patients, recevant chacun le même traitement standard ont été comparés¹⁰. Un groupe recevait, en plus du traitement conventionnel, un placebo et l'autre le bévacizumab. La médiane de survie des patients traités par placebo était de 15,6 mois et celle des patients recevant le bevacizumab de 20,3 mois, soit un gain de quelque 5 mois supplémen-

7. Kim K. *et al.*, Nature 362 : 841, 1993.

8. Warren R.S. *et al.*, J. Clin. Invest. 95 : 1789, 1995.

9. Yang J.C. *et al.*, New Engl. J. Med. 349 : 427, 2003.

10. Hurwitz H. *et al.*, New Engl. J. Med. 350 : 2335, 2004.

taires d'espérance de vie, résultats confirmés par une autre étude dans la même pathologie¹¹.

De nombreuses études sont en cours avec le bevacizumab et avec des inhibiteurs des récepteurs tyrosine-kinase du VEGF ou d'autres facteurs de croissance (cancers avancés du poumon, du sein, du rein, etc.). En attendant les résultats de ces essais de phase II et III, on peut conclure provisoirement que la preuve du concept de l'efficacité d'un traitement anti-angiogénique dans le cancer est bien étayée expérimentalement et chez l'homme. Toutefois, les résultats spectaculaires obtenus chez la souris ne sont pas reproduits chez l'homme. Le gain en espérance de vie est modeste : il s'agit d'agents cyostatiques dont l'évaluation, fondée essentiellement sur l'absence de progression de la tumeur n'est pas aisée, et qui doivent aujourd'hui être associés à un traitement standard. Cette thérapeutique est dans l'ensemble bien tolérée et n'entraîne pas, à l'inverse des médicaments chimiotoxiques ou de la radiothérapie, d'atteinte des cellules de la moelle osseuse. La limite de la thérapeutique anti-angiogénique peut être due à une résistance des cellules tumorales, à une sur-expression de facteurs angiogéniques additionnels, ou encore à une résistance liée aux cellules endothéliales ou aux cellules du stroma tumoral.

Le concept de « normalisation » de la vascularisation tumorale par anti-angiogénèse

L'hypothèse initiale de l'efficacité d'un traitement anti-angiogénique dans le cancer était qu'en supprimant les vaisseaux irriguant une tumeur, on entraînerait à tout le moins un arrêt de la croissance sinon une nécrose de la tumeur. En fait, plusieurs éléments remettent en cause cette hypothèse. Tout d'abord, il n'a pas été prouvé chez l'homme qu'un traitement anti-angiogénique prescrit isolément soit efficace. En fait, il est même possible que la destruction des vaisseaux tumoraux ait un effet aggravant sur la progression des tumeurs en stimulant vigoureusement la production de facteurs de croissance, notamment vasculaire, en réponse à l'hypoxie induite par le traitement anti-angiogénique. Le concept d'un autre mécanisme d'action des agents anti-angiogéniques, à vrai dire contre-intuitif, a été proposé notamment par R. Jain et collaborateurs¹². Selon cette théorie, les traitements anti-angiogéniques auraient pour effet d'élaguer les vaisseaux bourgeonnants et de permettre aux vaisseaux tumoraux de retrouver une architecture normale. Le traitement anti-angiogénique assurerait une fourniture optimale d'oxygène, de nutriments et de médicaments anti-cancéreux, ce qui permettrait une efficacité accrue de la chimiothérapie et de la radiothérapie dont la performance dépend d'une bonne oxygénation tissulaire.

Plusieurs expériences réalisées chez l'animal viennent conforter cette hypothèse. L'addition d'un anticorps dirigé contre le VEGFR-2 à la vinblastine, médicament cytotoxique, s'avère plus efficace que chacun des deux produits donnés à forte dose

11. Kabbinar F. *et al.*, *J. Clin. Oncol.* 23 : 3697, 2005.

12. Jain R.K., *Science* 307 : 58, 2005.

et isolément dans le neuroblastome chez la souris¹³. L'administration d'une molécule anti-angiogénique, l'angiostatine, n'inhibe que marginalement le développement d'un gliome chez la souris alors qu'associée à la radiothérapie on observe une régression de la tumeur et de sa vascularisation¹⁴. Le rôle de l'hypoxie dans la résistance à la radiothérapie des cellules cancéreuses est bien connu. Dans une étude réalisée chez la souris nude greffée avec un glioblastome ou un adénocarcinome colique humain et soumise à différentes conditions de normoxie ou d'hypoxie, le traitement anti-VEGF potentialise l'effet de la radiothérapie en conditions hypoxiques. Il compense ainsi la résistance à la radiothérapie induite par l'hypoxie¹⁵. Dans une étude mécanistique réalisée chez un petit nombre de patients atteints de cancer rectal, il a été montré que le bevacizumab, prescrit isolément avant l'intervention chirurgicale, diminue la perfusion sanguine dans la tumeur, abaisse la pression interstitielle intratumorale, et décroît le taux des précurseurs circulants des cellules endothéliales. À l'examen anatomopathologique, on note une réduction de la densité microvasculaire et une augmentation du nombre de vaisseaux recouverts de péricytes¹⁶, indice d'une meilleure architecture vasculaire. L'hypothèse proposée actuellement est donc que les traitements anti-angiogéniques pourraient rétablir les caractéristiques d'une vascularisation tissulaire « normale » dans la tumeur. L'organisation anarchique des vaisseaux tumoraux, leur morphologie anormale, leur perméabilité accrue favoriserait l'élévation de la pression interstitielle, l'hypoxie, une pénétration faible et hétérogène des produits anti-cancéreux. Le traitement anti-angiogénique supprimerait les capillaires immatures et régulariserait l'architecture des autres vaisseaux. Le tout permettrait un retour vers la normale de la pO_2 , de la pression interstitielle, et un meilleur apport des produits anti-cancéreux.

Des maladies héréditaires illustrant les relations entre oxygène, angiogénèse et cancer

L'oxygène est essentiel à la vie des organismes, des organes, des tissus et des cellules. Toute baisse de la concentration en oxygène risque d'avoir des conséquences dramatiques et, en cas d'hypoxie, de la cellule à l'organisme entier, s'élaborent immédiatement des stratégies pour tenter de rétablir un apport normal d'oxygène. L'une d'entre elles est la création de nouveaux vaisseaux par la mise en jeu du VEGF. Le maître d'œuvre est le facteur inductible par l'hypoxie (hypoxia-inducible factor — HIF- α) dont l'activité dépend étroitement de la pression partielle intracellulaire d'oxygène. En situation de normoxie, HIF- α est très rapidement dégradé dans le cytoplasme de la cellule par le protéasome. HIF- α présent dans le cytoplasme est véhiculé dans le protéasome après l'action d'une prolyl-hydroxylase suivie d'une interaction avec un partenaire protéique, la protéine de von Hippel-

13. Klement G. *et al.*, J.Clin. Invest. 105 : R1, 2000.

14. Griscelli F. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97 : 6698, 2000.

15. Lee C. *et al.*, Cancer Res. 60 : 5565, 2000.

16. Willett C. *et al.*, Nature Med. 10 : 145, 2004.

Lindau (pVHL). Lors d'une chute de la concentration d'oxygène dans la cellule, l'activité de la prolyl-hydroxylase est inhibée. Elle n'agit plus sur HIF- α qui ne peut plus à son tour interagir avec pVHL. HIF- α est alors transporté dans le noyau où après interaction avec une protéine partenaire stable appelée, ARNT (HIF-1 β), il déclenche la transcription de nombreux gènes. L'effet coordonné des gènes transcrits sous hypoxie par le couple HIF-1 β /HIF- α est de rétablir au plus vite la normoxie cellulaire. L'état d'hydroxylation de HIF- α par la prolyl-hydroxylase-2 dépend donc de la pression d'oxygène dans la cellule et cet état détermine la transcription de facteurs de croissance vasculaires, dont le VEGF. L'angiogenèse tumorale est la conséquence de la mise en jeu de ce mécanisme. Cette séquence d'évènements a été élucidée récemment, notamment grâce à l'étude de deux affections familiales, la maladie de von Hippel-Lindau et les paragangliomes héréditaires, qui illustrent tout particulièrement le lien entre régulation anormale de l'activité de HIF, angiogenèse et cancer.

La maladie de von Hippel-Lindau touche un individu sur 36 000 et, à l'âge de 65 ans, 20 % des patients atteints de la mutation souffrent d'une ou de plusieurs tumeurs bénignes ou malignes : kystes, tumeurs du système nerveux central, tumeurs de la rétine, du rein, du pancréas, de la glande surrénale (phéochromocytome)¹⁷. Le gène responsable de la maladie a été découvert en 1993. Ce gène code pour la protéine de von Hippel-Lindau (pVHL) qui est un élément essentiel de la régulation des gènes inductibles par l'hypoxie. À la suite de l'interaction de HIF-1 α , ou de son isoforme HIF-2 α , avec pVHL intervient une modification de la structure de HIF- α appelée ubiquitination. HIF- α ainsi ubiquitiné est transporté dans le protéasome où il est dégradé. La maladie de von Hippel-Lindau touche les deux sexes et un individu sur deux issu d'un parent atteint de la maladie. Elle est due à l'inactivation totale ou partielle de pVHL résultant de la délétion ou d'une mutation du gène VHL. L'autre allèle VHL est inactivé au cours de la vie dans des cellules d'un tissu qui, du fait de l'inactivation des deux allèles VHL, développera une tumeur. L'inactivation des deux allèles de VHL conduit à un accroissement de l'activité de HIF- α , à une synthèse accrue de VEGF et de PDGF, à une élévation du TGF α , tous éléments favorisant l'angiogenèse tumorale et la carcinogenèse. Ainsi, la perte totale de VHL se manifeste par des tumeurs hautement vascularisées comme l'hémangioblastome (au niveau de la rétine ou du système nerveux central) ou le cancer du rein¹⁸.

Les phéochromocytomes sont des tumeurs hautement vascularisées de la partie centrale de la glande surrénale, la médullaire surrénalienne ; 10 % d'entre eux sont héréditaires. Les paragangliomes sont des tumeurs du corpuscule carotidien ou de ganglions sympathiques. Dans 30 % des cas, ces tumeurs, souvent agressives et multiples, sont héréditaires. Les phéochromocytomes et les paragangliomes héréditaires peuvent être dus à une anomalie génétique du fonctionnement de la chaîne

17. Lonser R.R. *et al.*, Lancet 361 : 2059, 2003.

18. Kim W. and Kaelin W., J. Clin. Oncol. 22 : 4991, 2004.

respiratoire mitochondriale. La perte de fonction de gènes codant une enzyme de la chaîne respiratoire mitochondriale, la succinyl déshydrogénase, conduit à une accumulation de succinate, le substrat de l'enzyme, et à une baisse d'un des produits de la réaction, le 2-oxoglutarate. Or l'activité de la prolyl-hydroxylase est inhibée par le succinate. Son accumulation provoque une baisse de son activité, une moindre hydroxylation de HIF- α et, comme dans le cas de la maladie de von Hippel-Lindau une activation de l'angiogénèse et des voies de réponse à l'hypoxie^{19,20}.

À ces deux exemples de maladies héréditaires établissant un lien étroit entre oxygénation cellulaire, angiogénèse et tumorigénèse s'ajoute une autre maladie héréditaire rare, responsable de cancers familiaux du rein : l'inactivation génétique d'une autre enzyme du cycle de Krebs, la fumarate hydratase, entraîne une accumulation de son substrat, le fumarate. Or celui-ci inhibe la prolyl-hydroxylation de HIF- α , ce qui montre encore la relation directe entre dysrégulation du métabolisme du fumarate, inactivation de la prolyl-hydroxylase, tumorigénèse rénale et angiogénèse.

Une maladie non transmissible illustrant les relations entre oxygène, angiogénèse et cancer : le cancer conventionnel du rein

Le cancer conventionnel du rein, appelé antérieurement cancer du rein à cellules claires, est la forme la plus fréquente des cancers du rein²¹. Il existe dans 50 à 60 % des cas une inactivation de pVHL du fait d'une mutation affectant les deux allèles du gène VHL dans les cellules du tube proximal du néphron. Cette inactivation reproduit à minima, dans les cellules rénales, la maladie de von Hippel-Lindau, maladie génétique qui touche toutes les cellules de l'organisme. Elle explique l'hypervascularisation de ce type de cancer et montre, une fois de plus, les rapports étroits entre oxygène, angiogénèse et cancer.

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, E. JONES, B. LARRIVÉE, M. TROMBE, B. DE LAFARGE, K. BOUVRÉE, C. BREANT

I-1. Identification, émergence et mobilisation de cellules endothéliales et/ou de progéniteurs endothéliaux circulant chez l'embryon

Au moyen de parabioses caille/poulet et par une analyse immunohistochimique utilisant l'anticorps monoclonal QH1, spécifique des cellules endothéliales de la

19. Gimenez-Roqueplo A.P. *et al.*, Am. Hum. Genet. 69 : 1186, 2001.

20. Gimenez-Roqueplo A.P. *et al.*, Cancer Res. 63 : 5615, 2003.

21. Cohen H.T. and McGovern F., New Engl. J. Med. 353 : 2477, 2005.

caille, nous avons identifié des cellules endothéliales et/ou des progéniteurs endothéliaux circulant chez l'embryon. Ces cellules sont présentes très tôt au cours de l'ontogenèse, avant le troisième jour embryonnaire. Dans les conditions normales, elles s'intègrent dans la plupart des tissus mais leur nombre est restreint. Lorsque des réponses angiogéniques sont induites par des blessures ou des greffes sur la membrane chorioallantoïdienne, ces cellules circulantes sont rapidement mobilisées et intègrent sélectivement les sites de néoangiogenèse. Cette mobilisation est indépendante de la présence de la moelle osseuse puisqu'elle est effective avant que cet organe ne se différencie. Un résultat intéressant est l'absence de cette mobilisation au cours du processus de bourgeonnement résultant d'un traitement de la membrane chorioallantoïdienne par le VEGF.

Ainsi, chez l'embryon, les cellules endothéliales circulantes sont mobilisables au cours de l'établissement précoce de connections vasculaires pour pallier l'ischémie induite par une blessure ou une greffe, mais elles ne sont pas impliquées lors du processus classique d'angiogenèse par bourgeonnement vasculaire (Pardanaud L. & Eichmann A., 2006).

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 au facteur de guidage axonal nétrine-1, UNC5B, s'exprime dans les cellules spécialisées situées à l'extrémité des capillaires, « les tip cells », qui sont morphologiquement similaires aux cônes de croissance des axones. La perte de fonction d'*Unc5b* chez l'embryon de souris ou du 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, et cet effet est perdu dans les mutants *Unc5b*. UNC5B fonctionne donc comme un récepteur de guidage répulsif contrôlant la morphogenèse du système vasculaire (Suchting *et al.* 2006, Eichmann & Klagsbrun, 2005, Eichmann *et al.* 2005 a, b).

De même façon que les molécules de guidage axonal régulent le développement capillaire, des facteurs de croissance régulant le développement des vaisseaux sanguins sont impliqués dans le développement neural. Nous avons montré que le VEGF-C, connu pour son rôle dans la migration, la prolifération et la survie des cellules endothéliales lymphatiques, joue également un rôle crucial pour la prolifération de certains précurseurs neuronaux qui expriment son récepteur VEGFR-3. L'inactivation génique du VEGF-C par knock-down chez l'embryon de Xénope provoque une diminution significative de la prolifération des précurseurs ventriculaires du cerveau antérieur exprimant le VEGFR-3, sans affecter le développement du réseau

vasculaire intracérébral. L'inactivation génique du VEGF-C par knock-out chez l'embryon de souris induit une diminution significative de la prolifération des pré-curseurs oligodendrocytaires du nerf optique et des progéniteurs ventriculaires du bulbe olfactif. Ces deux populations de progéniteurs neuraux sont caractérisées par l'expression du VEGFR-3 (LeBras *et al.*, 2006).

II — HYPOXIE, ANGIOGÈNESE : PROTÉINES MATRICIELLES EN PATHOLOGIE CARDIO-VASCULAIRE ET TUMORALE

Équipe : S. GERMAIN, C. MONNOT, L. MULLER, A. BARRET,

C. ARDIDIE-ROBOUANT, J. PHILIPPE, E. ÉTIENNE, E. GOMEZ, A. CAZES,

A. GALAUP, N. BRÉCHOT, J. VERINE, C. CHOMEL, M. BIGNON, S. WAGNER

Moduler l'angiogenèse, 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 cardio-vasculaires. L'hypoxie est un stimulus majeur de l'angiogenèse et l'objectif de ce projet est la recherche de nouveaux mécanismes moléculaires impliqués dans l'hypoxie cellulaire ou tissulaire ainsi que dans l'angiogénèse réactionnelle. Cette étude a été initiée par criblage différentiel des ARNm de cellules endothéliales soumises à un stress hypoxique par rapport aux mêmes cellules cultivées en condition témoin (normoxie). Trois cent cinquante gènes dont l'expression est induite par l'hypoxie ont déjà été identifiés.

L'ensemble des résultats du criblage différentiel effectué sur cellules endothéliales soumises à l'hypoxie a été confirmé par des techniques complémentaires telles que l'hybridation de puces cDNA, sur lesquelles ont été immobilisés les cDNAs issus du criblage. 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'angiogenèse par l'hypoxie ne sont pas caractérisés : IGF-Binding Protein 3 (IGFBP-3), la neuritine et la Thioredoxin-interacting protein. L'hybridation *in situ* nous permet de caractériser l'expression de ces gènes et d'identifier de nouveaux marqueurs tumoraux ou d'un type cellulaire dans différents cancers, corroborant notre hypothèse initiale de travail.

Avant de poursuivre l'analyse de la fonction de certains 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 ? L'ensemble de nos efforts se concentrent sur l'Angiopoietin-like 4 (ANGPTL4) et la thrombospondine-1 (TSP1). 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. Nous avons montré que l'expression de ce gène est induit par l'hypoxie dans les cellules endothéliales. En pathologie cardio-vasculaire, ANGPTL4 est exprimé dans les régions ischémiques chez les patients atteints d'ischémie critique

des membres inférieurs ainsi que dans le cœur ayant subi une ischémie. 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.

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 la migration et l'adhésion des cellules endothéliales, par rapport à une matrice contrôle. Ce processus s'accompagne d'un étalement intermédiaire des HUVEC, associé à une diminution des fibres de stress et des points focaux d'adhésion.

ANGPTL4 étant induit par l'hypoxie et interagissant avec la matrice extracellulaire, nous avons émis l'hypothèse que cette protéine pouvait 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 montrons que les cellules de carcinome pulmonaire 3LL xénogreffées sous la peau de souris nude métastacent 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 métastacent 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, 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 perméabi-

lité vasculaire et les propriétés de motilité et d'invasion des cellules tumorales. L'ensemble de ces résultats font l'objet d'un article soumis à publication.

Dans le cadre d'un réseau INSERM dédié à l'étude des cellules souches, nous étudions le transcriptome et le protéome ainsi que les propriétés angiogéniques de progéniteurs endothéliaux circulants adultes. Le rôle éventuel des protéines de la famille des ANGPTLs à moduler l'amplification de ces cellules est aussi étudiée, comme cela a été montré pour les cellules hématopoïétiques.

En plus des variations d'expression de gènes associés aux processus hypoxiques, il existe des protéines subissant des variations d'expression et/ou des modifications post-traductionnelles. Il apparaît également important d'analyser des « sous-protéomes » et notamment l'action concertée de différentes protéines matricielles constituant le micro-environnement de la paroi vasculaire. Nous menons une analyse de l'expression de protéines associées à la MEC orientée vers les protéines matricielles candidates déjà connues, dont certains membres de la famille des CCN exprimés par les cellules endothéliales, Cyr61, Nov et CTGF, osteonectine (SPARC) et IGFBP3. Le profil d'expression de Cyr61, Nov et ANGPTL4 a été établi au laboratoire dans le milieu de sécrétion et la MEC de cultures primaires d'HUVEC. D'autre part nous menons un projet d'identification de protéines modulées par l'hypoxie dans la MEC subendothéliale. Dans les deux cas, nous nous intéressons à la modulation de l'expression et de la biodisponibilité des formes matricielles et solubles de ces protéines.

Parallèlement à la caractérisation de protéines matricielles candidates, nous menons un projet d'identification des protéines sécrétées et associées à la MEC, induites par l'hypoxie au niveau de l'endothélium et affectant les réponses vasculaires. Ce projet est basé sur une approche protéomique différentielle sans *a priori*, par technique de séparation des protéines en électrophorèse bidimensionnelle. Notre étude étant orientée vers l'analyse des facteurs bioactifs et non structuraux de la MEC. Nous analysons également les milieux de sécrétion, dans la mesure où une partie des protéines matricielles sont aussi solubles dans le milieu de culture. La validation de cette approche nous a été fournie par la détection d'ANGPTL4 dans nos échantillons. Les analyses en électrophorèse bidimensionnelle nous ont permis de détecter plusieurs centaines de spots de protéines dans nos échantillons de MEC, parmi lesquels 6 spots sont fortement induits par l'hypoxie et dont l'identification en est en cours par spectrométrie de masse.

III — SYSTÈME RÉNINE, ANGIOGÈNE ET PATHOLOGIE CARDIO-VASCULAIRE

Équipe : P. CORVOL, G. NGUYEN, C. HUBERT, J.-M. GASC, N. LAMANDÉ, H. KEMPF, A. MICHAUD, M.-T. MORIN, I. QUEGUINER, M. CLEMESSY, A. CONTREPAS, G. SIHN, E. LARGER, G. LEDOUX, F. VINCENT, A. CAILLARD, N. PRAIZOVIC, L. LI

III-1. Système Rénine-Angiotensine

Les travaux de cette équipe se sont poursuivis dans plusieurs directions :

a) Rôle anti-angiogénique de l'angiotensinogène

L'angiotensinogène est le substrat de la rénine. Il s'agit d'une protéine de 65 kDa qui comporte à son extrémité N-terminale la séquence du décapeptide angiotensine I. L'angiotensine I est clivée par la rénine humaine au niveau de la liaison Leu¹⁰-Val¹¹ ensuite convertie en angiotensine II par l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE). Jusqu'à présent, il n'existait aucune autre fonction connue à l'angiotensinogène que celle de servir de précurseur de l'angiotensine I. Nous avons montré que l'angiotensinogène fait partie de la super-famille des serpinines sur trois arguments : similitude de séquence protéique, organisation du gène proche de celle des autres serpinines et structure tri-dimensionnelle de l'angiotensinogène voisine de celle d'autres serpinines (J. Célérier *et al.*, J. Biol. Chem. 2000).

Plusieurs serpinines exercent un effet anti-angiogénique : l'antithrombine III le pigment epithelial derived factor (PEDF), la maspinine, la kallistatine. Il semble que le PEDF contrôle le développement de la vascularisation rétinienne grâce à cet effet anti-angiogénique car le blocage du PEDF s'accompagne d'une vascularisation accrue de la rétine. Du fait de l'appartenance de l'angiotensinogène à la famille des serpinines, nous avons émis l'hypothèse que l'angiotensinogène pouvait exercer un effet anti-angiogénique. Dans un premier travail, réalisé *in vitro* et *in ovo*, nous avons montré que l'angiotensinogène inhibait la croissance des cellules endothéliales et leur migration, et qu'il exerçait un net effet anti-angiogénique dans le modèle de la membrane chorioallantoïdienne de poulet (J. Célérier *et al.*, Hypertension 2002). Nous avons cherché à savoir : 1) si l'angiotensinogène pouvait contrôler le développement et l'architecture des vaisseaux, 2) si l'administration d'angiotensinogène pouvait ralentir la tumorigénèse par un effet anti-angiogénique dans différents modèles expérimentaux.

L'effet potentiel de l'angiotensinogène dans le remodelage vasculaire *in vivo* a été étudié chez des souris transgéniques surexprimant l'angiotensinogène humain. L'épaisseur de la paroi vasculaire (tunica media) a été mesurée grâce à un anticorps anti- α -actine. La paroi des artérioles rénales des souris mâles surexprimant l'angiotensinogène humain était réduite de 22 % par rapport à celle des souris contrôles. Le calibre des autres artères n'était pas affecté. Ce résultat est à mettre en parallèle avec l'expression marquée de l'angiotensinogène humain dans les artères rénales

des souris transgéniques et nulle ou très réduite dans les autres organes. L'angiotensinogène humain n'étant pas clivé par la rénine de la souris, la réduction de l'épaisseur de la paroi vasculaire est le fait de l'angiotensinogène lui-même et non de l'angiotensine II. Cette réduction n'est pas due à une hypotrophie ou à une hypoplasie. Cette observation montre pour la première fois qu'une expression importante d'angiotensinogène peut inhiber la croissance des artères rénales *in vivo* (Brand M. *et al.*, Hypertension 2006).

L'effet anti-angiogénique de l'angiotensinogène a été étudié en construisant un adénovirus recombinant où le gène de l'angiotensinogène (AGT) est sous le contrôle du promoteur du cytomégalovirus (AdAGT). *In vitro*, AdAGT inhibe sélectivement la prolifération des cellules endothéliales. *In vivo*, l'injection de AdAGT chez des souris nues, chez qui le carcinome mammaire humain MDA-M13-231 avait été greffé, inhibe de 70 % la progression tumorale en comparaison avec les contrôles. Chez 21 % des souris, on observe une régression totale. On note une suppression de la vascularisation intra-tumorale et une nécrose marquée. Dans un autre modèle (mélanome B16F10 chez la souris), l'infestation préalable des cellules B16F10 *in vitro* par AdAGT bloque la tumorigénicité qui se développe ultérieurement *in vivo*. Enfin, les souris surexprimant l'angiotensinogène humain ne développent que peu de métastases pulmonaires par rapport aux contrôles lorsqu'elles reçoivent par voie iv les cellules B16F10. L'ensemble de ces résultats, utilisant plusieurs modèles de tumorigénèse, démontrent que l'angiotensinogène est un puissant facteur anti-angiogénique, indépendamment de la production d'angiotensine II (C. Bouquet *et al.*, Mol. Ther. 2006). L'administration intra-tumorale d'angiotensinogène par transfert génique offre une stratégie inédite et prometteuse pour inhiber la croissance tumorale et prévenir les métastases.

b) Rôle de l'activité dipeptidasique de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE) dans la fertilité

Outre ses effets bien connus sur le contrôle de l'hémodynamique cardio-vasculaire, l'ACE exerce un contrôle sur la fertilité de la souris mâle. Cet effet inattendu a été découvert par l'inactivation du gène de l'ACE (Krege J.H. *et al.*, Nature 1995) : les mâles dont le gène de l'ACE est inactivé sont infertiles. L'ACE testiculaire, présent dans les spermatides après réduction méiotique, ne comporte qu'un site catalytique correspondant au domaine C-terminal de l'ACE somatique. Afin de savoir si l'ACE testiculaire exerçait cet effet sur la fertilité *via* son activité dipeptidasique, nous avons remplacé le gène de l'ACE chez la souris par un gène où la seule modification apportée était l'inactivation du site catalytique C-terminal par mutagenèse dirigée (knock-in). Les animaux ainsi générés n'ont pas de phénotype cardio-vasculaire apparent. Le domaine N-terminal, resté actif, est capable de suppléer le domaine C-terminal inactivé. L'expression de l'ACE testiculaire est normale mais son activité catalytique est nulle. Toutefois, les animaux sont stériles, montrant que l'effet de l'ACE sur la fertilité chez la souris mâle est médié par l'activité dipeptidasique de l'ACE testiculaire (Fuchs S. *et al.*, Nature Med. 2005). Ce travail

ne confirme pas les travaux récents de Kondoh *et al.* qui suggéraient que l'effet de l'ACE sur la fertilité était lié à une solubilisation de certaines protéines liées à la membrane par une ancre GPI. Ces résultats ouvrent la voie à une recherche d'inhibiteurs sélectifs du domaine C-terminal de l'ACE qui pourraient inhiber la fertilité masculine.

III-2. Angiogenèse et diabète

Les conséquences délétères du diabète sur la vascularisation cardiaque sont connues mais leurs mécanismes d'action ne sont toujours pas élucidés. Un diabète maternel mal contrôlé, qu'il soit gravidique ou déclaré avant la grossesse, a de graves conséquences sur le fœtus. Afin d'étudier les conséquences d'une hyperglycémie modeste sur le développement vasculaire, nous avons utilisé le modèle de l'embryon de poulet. Le doublement de la glycémie au cours de l'embryogenèse chez le poulet s'accompagne dans les jours qui suivent son induction d'une anomalie du développement des vaisseaux de la membrane chorioallantoïdienne : apoptose marquée des cellules endothéliales et des péricytes, sans apparemment de modification de l'expression des facteurs de croissance vasculaire (Larger E. *et al.*, Diabetes, 2004).

Nous utilisons le même modèle pour l'étude de la formation des vaisseaux coronaires, de la microvascularisation myocardique et de l'expression des facteurs de croissance vasculaire et de leurs récepteurs au niveau cardiaque. Les premiers résultats obtenus montrent : 1) à 5 et 7 jours d'hyperglycémie, une nette réduction de la croissance pondérale de l'embryon, 2) une augmentation du rapport poids cœur/poids total, 3) une augmentation sélective de l'épaisseur de la paroi ventriculaire gauche, 4) une coronarographie par fluorescéine à 7 j. montre un défaut de vascularisation qui semble toucher les vaisseaux coronariens de petit calibre, 5) une nette diminution de la microvascularisation myocardique, significative dès le 4^e jour d'hyperglycémie.

L'étude porte actuellement sur les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans ces anomalies, avec une attention particulière sur les voies dépendantes de l'hypoxie (HIF-1 α et HIF-2 α), les facteurs de croissance vasculaire (VEGF, angiopoïétines) et leurs récepteurs (Caillard A., résultats non publiés).

LISTE DE PUBLICATIONS DU LABORATOIRE 2005-2006

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.

ASSIE G., AUZAN C., GASC J.-M., BAVIERA E., BALATON A., ELALOUF J.-M., JEUNEMAITRE X., PLOUIN P.-F., CORVOL P. and CLAUSER E. Steroidogenesis in aldosterone-producing adenoma revisited by transcriptome analysis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 90 : 6638-6649, 2005.

RIVIÈRE G., MICHAUD A., BRETON C., VANCAMP G., LABORIE C., ENACHE M., LESAGE J., DELOOF S., CORVOL P. and VIEAU D. Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) and ACE activities display tissue-specific sensitivity to undernutrition-programmed hypertension in the adult rat. *Hypertension* 46 : 1169-1174, 2005.

FAVIER J., GERMAIN S., EMMERICH J., CORVOL P. and GASC J.-M. Critical overexpression of thrombospondin 1 in chronic leg ischaemia. *J. Pathol.* 207 : 358-366, 2005.

EGIDY G., ROBERT B., CORVOL P., FERRE F. and PINET F. The endothelin system and renin in human fetal membranes. *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-Grand)* 51 Suppl. : OL839-847, 2005.

FUCHS S., FRENZEL K., HUBERT C., LYNG R., MULLER L., MICHAUD A., XIAO H.D., ADAMS J.W., CAPECCHI M.R., CORVOL P., SHUR B.D. and BERNSTEIN K.E. Male fertility is dependent on dipeptidase activity of testis ACE. *Nat. Med.* 11 : 1140-1142 ; author reply 1142-1143, 2005.

MEIDAN R., KLIPPER E., GILBOA T., MULLER L. and LEVY N. Endothelin-converting enzyme-1, abundance of isoforms a-d and identification of a novel alternatively spliced variant lacking a transmembrane domain. *J. Biol. Chem.* 280 : 40867-40874, 2005.

KERMORVANT-DUCHEMIN E., SENNLAUB F., SIRINYAN M., BRAULT S., ANDEFINGER G., KOOLI A., GERMAIN S., ONG H., D'ORLÉANS-JUSTE P., GOBEIL J.R. F., ZHU T., BOISVERT C., HARDY P., JAIN K., FALCK J.R., BALAZY M. and CHEMTOB S. Transarachidonic acids generated during nitrate stress induce microvascular degeneration via a thrombospondin-1-dependent pathway. *Nat. Med.* 11 : 1339-1345, 2005.

SMADJA D., BIECHE I., UZAN G., BOMPAIS H., MULLER L., BOISSON-VIDAL C., VIDAUD C., AIACH M. and GAUSSEM P. PAR-1 Activation on Human Late Endothelial Progenitor Cells Enhances Angiogenesis In Vitro With Upregulation of the SDF-1/CXCR4 System. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25 : 2321-2327, 2005.

HUS-CITHAREL A., ITURRIOZ X., CORVOL P., MARCHETTI J. and LLORENS-CORTES C. Tyrosine kinase and mitogen-activated protein kinase/extracellularly regulated kinase differentially regulate intracellular calcium concentration responses to angiotensin II/III and bradykinin in rat cortical thick ascending limb. *Endocrinology* 147 : 451-463, 2006.

LE JAN S., LE MEUR N., CAZES A., PHILIPPE J., LE CUNFF M., LÉGER J., CORVOL P. and GERMAIN S. Characterization of the expression of the hypoxia-induced genes *neuritin*, *TXNIP* and *IGFBP3* in cancer. *FEBS Lett.* 580 : 3395-3400, 2006.

BRAND M., LAMANDÉ N., SIGMUND C.D., LARGER E., CORVOL P. and GASC J.-M. Angiotensinogen modulates renal vasculature growth. *Hypertension* 47 : 1067-1074, 2006.

GELLER D.S., ZHANG J., ZENARO M.-C., VALLO-BOADO A., RODRIGUEZ-SORIANO J., FURU L., HAWS R., METZGER D., BOTELHO B., KARAVITI L., HAQQ A.M., COREY H., JANSSENS S., CORVOL P. and LIFTON R.P. Autosomal dominant pseudohypoadosteronism type 1 : mechanisms, evidence for neonatal lethality, and phenotypic expression in adults. *J. Am. Soc. Nephrol.* 17 : 1429-1436, 2006.

BOUQUET C., LAMANDÉ N., BRAND M., GASC J.-M., JULLIENNE B., FAURE G., GRISCELLI F., OPOLON P., CONNAULT E., PERRICAUDET M. and CORVOL P. Suppression of angiogenesis, tumor growth, and metastasis by adenovirus-mediated gene transfer of human angiotensinogen. *Mol. Ther.* 2006.

SIHN G., SAVARY K., MICHAUD A., FOURNIE-ZALUSKI M.-C., ROQUES B.P., CORVOL P. and GASC J.-M. Aminopeptidase N during the ontogeny of the chick. *Differentiation* 74 : 119-128, 2006.

BURCKLE C.A., JAN DANSER A.H., MULLER D.N., GARRELD S.I.M., GASC J.-M., POPOVA E., PLEHM R., PETERS J., BADER M. and NGUYEN G. Elevated blood pressure and heart rate in human renin receptor transgenic rats. *Hypertension* 47 : 552-556, 2006.

PARDANAUD L. and EICHMANN A. Identification, emergence and mobilization of circulating endothelial cells or progenitors in the embryo. *Development* 133 : 2527-2537, 2006.

LE BRAS B., BARALLOBRE M.J., HOMMAN-LUDIYE J., NY A., WYNS S., TAMMELA T., HAIKO P., KARKKAINEN M.J., YUAN L., MURIEL M.P., CHATZOPPOULOU E., BREANT C., ZALC B., CARMELIET P., ALITALO K., EICHMANN A. and THOMAS J.L. VEGF-C is a trophic factor for neural progenitors in the vertebrate embryonic brain. *Nat. Neurosci.* 9 : 340-348, 2006.

CASTROP H., OPPERMANN M., WEISS Y., HUANG Y., MIZEL D., LU H., GERMAIN S., SCHWEDA F., THEILIG F., BACHMANN S., BRIGGS J., KURTZ A. and SCHNERMANN J.

Reporter gene recombination in juxtaglomerular granular and collecting duct cells by a human renin promoter-cre recombinase transgene. *Physiol. Genomics* 25 : 277-285, 2006.

Revues, 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., LENOBLE F., AUTIERO M. and CARMELIET, P. Guidance of vascular and neuronal network formation. *Curr. Opin. 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. *Cardio-vasc. 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.

KLAGSBRUN M. and EICHMANN A. A role for axon guidance receptors and ligands in blood vessel development and tumor angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev.* 16 : 535-548, 2005. Review.

NGUYEN G., JAN DANSER A.H., BURCKLE C., BADER M. and MULLER D.N. (Pro)renin receptors : their functional properties. In *Molecular Mechanisms of Hypertension* pp. 69-73, 2005.

HUBERT C., SAVARY K., GASC J.-M. and CORVOL P. The hematopoietic system : a new niche for the renin-angiotensin system. *Nat. Clin. Pract. Cardio-vasc. Med.* 3 : 80-85, 2006. Review.

SUCHTING S., BICKNELL R. and EICHMANN A. Neuronal clues to vascular guidance. *Exp. Cell. Res.* 312 : 668-675, 2005. Review.

NGUYEN G. Renin/prorenin receptors. *Kidney Int.* 69 : 1503-1506, 2006.

EXPOSÉS - CONGRÈS - ENSEIGNEMENTS

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

2005 : Conférence IPSEN — « Deciphering the vascular tree » — Paris (Octobre 2005) ; Meeting Franco-Indien — Calcutta (Octobre 2005) ; Conférence Société Britannique d'Endocrinologie — Londres (Novembre 2005).

2006 : Société Européenne de Cardiologie — Paris (Janvier 2006) ; Séminaire du Laboratoire de Physique de Nancy — Nancy (Février 2006) ; Actualités Néphrologiques de Necker — Paris (Avril 2006) ; Conférence ISIS — Strasbourg (Mai 2006).

Monsieur Pierre Corvol a été fait Doctor Honoris Causa de l'Université de Genève (6 Juin 2006).