

## **Médecine expérimentale**

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

### **NOUVEAUX ASPECTS DE L'ANGIOGENÈSE**

Au cours de l'année 2002-2003, le cours de la Chaire de Médecine Expérimentale a porté essentiellement sur les relations entre l'angiogenèse et l'adipogenèse. Il existe en effet des rapports étroits entre le développement du tissu adipeux et celui du système vasculaire. Plusieurs gènes adipocytaires influencent le développement local du système vasculaire. Trois catégories de gènes participent au remodelage vasculaire et ont été particulièrement abordés dans ce cours : la leptine, les peroxysome proliferator-activated receptors (PPARs) et les angio-poïétin related proteins. À l'inverse, le développement du tissu adipeux dépend lui-même du réseau vasculaire. Ainsi, l'équipe de Folkman a montré que l'inhibition de l'angiogenèse dans divers modèles d'obésité chez la souris conduit à une réduction de la masse adipeuse (PNAS, 2002).

### **Épidémiologie de l'Obésité**

Ce sujet prend toute son actualité du fait de la prévalence croissante de l'obésité dans le monde et en France. En vingt ans, la prévalence de l'obésité (indice de masse corporelle  $\geq 30$  Kg/m<sup>2</sup>) est passée de 6,1 % à 9,6 %. L'obésité s'accompagne de complications cardiovasculaires (essentiellement coronaropathies et accidents vasculaires cérébraux), respiratoires, métaboliques (diabète de type 2 et syndrome métabolique X) et endocriniennes. Le risque d'infarctus fatal et non fatal est multiplié par 3,5 chez la femme de 30 à 55 ans lorsque l'on passe d'un indice de masse corporelle de moins de 21 à plus de 29 Kg/m<sup>2</sup>.

### **Obésité et leptine**

L'obésité est due à une hypertrophie et une hyperplasie du tissu adipeux blanc. Son origine est complexe puisqu'elle est déterminée par des facteurs génétiques

et environnementaux auxquels s'associent des facteurs métaboliques et endocriniens, ainsi que des paramètres tels que l'âge, l'ethnie, le sexe. Quelques gènes ont été impliqués dans les formes d'obésité monogénique chez les rongeurs et chez l'homme. Une obésité massive s'observe chez les souris *ob/ob* (inactivation du gène de la leptine) et chez les souris *db/db* déficientes en récepteur de la leptine. La découverte de la leptine a montré pour la première fois qu'une hormone sécrétée par l'adipocyte — et dont la sécrétion et le taux plasmatique dépendent de la masse adipeuse et de la taille cellulaire — avait une action centrale. L'activation du récepteur de la leptine au niveau hypothalamique entraîne une augmentation du tonus sympathique et de la dépense énergétique, en même temps qu'une diminution de la prise alimentaire. Ainsi était montrée pour la première fois une relation entre la masse grasse, le contrôle central de la dépense énergétique et l'apport calorique.

### Propriétés angiogéniques du tissu adipeux — Rôle de la leptine

La découverte d'une activité angiogénique du tissu adipeux remonte à plusieurs décennies : l'implantation ou la greffe de tissu adipeux viscéral provoque une angiogénèse et améliore localement la cicatrisation de différents types de tissus. Plus récemment, une activité angiogénique des adipocytes différenciés en culture cellulaire a été découverte. C'est ainsi que le tissu adipeux est capable de produire des facteurs pro-angiogéniques tels que le VEGF, le FGF2, l'angiopoïétine 2, le TNF $\alpha$ , la NO-synthase inductible, différentes métalloprotéases ainsi que l'uPA et le PAI-I. À la suite de la découverte de la leptine, la question s'est posée de savoir si le développement du lit vasculaire du tissu adipeux pouvait être relié au nombre et à la taille des adipocytes et donc si la leptine pouvait avoir un rôle directement angiogénique. Les équipes de R. Sierra-Honigsmann *et al.* (Nature, 1998) et de A. Bouloumié *et al.* (Circ. Res., 1998) ont montré que les cellules endothéliales exprimaient le récepteur de la leptine et que l'activation de ce récepteur augmentait la survie et la prolifération des cellules endothéliales. La leptine exerce un effet angiogénique *in vitro* (formation de tubes en gel de collagène) et *in vivo* (effet angiogénique sur la cornée de rat et néoangiogénèse sur la membrane chorioallantoïdienne). La leptine a comme particularité d'entraîner une fenestration des capillaires dans les sites de production (R. Cao *et al.*, PNAS, 2002). Elle agit de façon synergistique avec le VEGF et le FGF2.

L'angiogénèse dépend étroitement de la pression partielle d'oxygène au niveau tissulaire et cellulaire. L'hypoxie entraîne une induction de l'angiogénèse notamment par mise en jeu d'un facteur de transcription, hypoxia inducible factor (HIF-1 $\alpha$ ). La leptine est augmentée dans le placenta au cours de la pré-éclampsie, ce qui a fait chercher à Grosfeld *et al.* la possibilité que la leptine puisse être induite par l'hypoxie et que HIF-1 $\alpha$  puisse être impliqué dans cette réponse. De fait, la leptine est augmentée par l'hypoxie dans les adipocytes humains différenciés et les cellules trophoblastiques en culture. Ces mêmes auteurs ont montré

l'existence d'une régulation transcriptionnelle de la leptine sous la dépendance de HIF-1 $\alpha$  (Grosfeld *et al.*, J. Biol. Chem., 2002).

Il existe par ailleurs plusieurs arguments laissant penser que la leptine pourrait jouer un rôle sur la paroi artérielle et les complications cardiovasculaires. En effet, Farhami *et al.* (Circulation, 2001) ont montré l'existence d'un « système leptine » dans la paroi artérielle et l'induction par la leptine de calcifications dans des cultures de « calcifying vascular cells », sous-population de cellules de la paroi artérielle qui peuvent subir une différenciation ostéoblastique. La leptine aurait donc un effet angiogénique mais pourrait aussi exercer un effet pathogène sur la paroi artérielle.

Il existe une relation négative entre le taux sérique de la leptine et la distensibilité artérielle chez des adolescents sains et la leptine est un facteur de risque indépendant pour les maladies coronariennes, ainsi qu'il a été montré dans l'analyse d'un sous-groupe de l'étude Woscops (Wallace, Circulation, 2001). Les actions cardiovasculaires de la leptine sont donc complexes. D'un côté, la leptine exerce un effet pro-angiogénique et augmente la production de monoxyde d'azote dans les cellules endothéliales *in vitro*. D'un autre côté, elle serait capable de provoquer des calcifications vasculaires, d'augmenter le tonus sympathique et le stress oxydant, toutes circonstances favorisant l'inflammation vasculaire et l'athérogenèse. Le bilan net de l'action de la leptine sur le plan cardiovasculaire est encore difficile à établir et méritera des études approfondies tant sur le plan expérimental que clinique.

### **Propriétés angiogéniques du tissu adipeux — Rôle des peroxysome proliferator-activated receptors (PPARs)**

Un autre lien important entre adipogenèse et angiogenèse est celui des facteurs de transcription nucléaires de la famille des PPARs. Les PPARs  $\alpha$ ,  $\gamma$  et  $\Delta$  ( $\beta$ ) jouent un rôle important dans l'homéostasie glucidique et lipidique et contrôlent la prolifération et la différenciation de divers types cellulaires. Les PPARs agissent sous la forme d'hétérodimères avec les RXRs (retinoid X receptor, -9cisRA). PPAR $\alpha$  est essentiellement exprimé dans le foie et le tissu adipeux brun et joue un rôle essentiel dans l'oxydation des acides gras. Il est mis en jeu lors du jeûne. PPAR $\gamma$  est exprimé au niveau du tissu adipeux, du colon, du système immunitaire et de la rétine. Il est impliqué dans le métabolisme lipidique et glucidique, dans la différenciation pré-adipocytaire et macrophagique. Son rôle essentiel est d'être lipogénique dans des conditions d'anabolisme. PPAR $\gamma$  est aussi impliqué dans l'angiogenèse. Les ligands naturels des PPARs sont des leucotriènes et des dérivés de prostaglandines. Les fibrates sont des agonistes synthétiques de PPAR $\alpha$  et les thiazolidinediones des agonistes de PPAR $\gamma$ . PPAR $\gamma$ , en synergie avec un autre facteur de transcription, C/EBP $\alpha$ , est impliqué dans la différenciation des pré-adipocytes en adipocytes. Cet effet sur la différenciation de PPAR $\gamma$  pourrait ne pas être limité à l'adipocyte — rôle incontesté — mais à d'autres

types cellulaires et notamment tumoraux. Les thiazolidinediones, agonistes des PPAR $\gamma$ , pourraient avoir un effet anti-tumoral dans le cancer du colon, les liposarcomes, le cancer de la prostate. Toutefois, cet effet anti-tumoral des agonistes de PPAR $\gamma$  est controversé car plusieurs auteurs ont montré que l'activation de PPAR $\gamma$  entraîne le développement de tumeurs coliques chez la souris.

Le rôle de PPAR $\gamma$  dans l'angiogenèse est, lui aussi, sujet à discussion. Une première étude réalisée par Xin *et al.* (J. Biol. Chem., 1999) rapporte une inhibition *in vitro* et *in vivo* de l'angiogenèse par les ligands de PPAR $\gamma$ . Ces auteurs ont montré la présence de PPAR $\gamma$  dans les cellules endothéliales et observé l'inhibition de la formation de tubes capillaires en gel de collagène par l'administration d'agonistes de PPAR $\gamma$ . En outre, l'angiogenèse induite par le VEGF dans la cornée de rat est inhibée par l'administration concomitante d'agonistes de PPAR $\gamma$ . Une autre étude aboutit à des conclusions inverses : Panigrahy *et al.* (J. Clin. Invest., 2002) montre l'expression de PPAR $\gamma$  dans l'endothélium de tissus normaux et néoplasiques. L'utilisation de thiazolidinediones, à doses peu élevées — et donc ne stimulant *a priori* que PPAR $\gamma$  —, aboutit à une série d'évènements anti-angiogéniques : inhibition de la prolifération des cellules endothéliales en culture, diminution de la production de VEGF au niveau tumoral (modèle de tumorigenèse chez la souris), inhibition de la néo-angiogenèse au niveau de la cornée et de la membrane chorioallantoïdienne. Ces auteurs montrent que les thiazolidinediones inhibent la croissance des tumeurs allogéniques chez la souris, réduisent la densité vasculaire et inhibent l'apparition de métastases lors de l'ablation de la tumeur primaire dans le modèle du carcinome pulmonaire de Lewis (LLC).

### **Propriétés angiogéniques du tissu adipeux — Rôle des angiopoïétin-related proteins (ARPs)**

Une autre classe de protéines impliquées à la fois dans le métabolisme lipidique et l'angiogenèse sont les angiopoïétin related protein (ARPs). Les ARPs ont une homologie d'environ 30 % avec l'angiopoïétine 1 et 2, molécules se liant toutes les deux au récepteur endothélial tyrosine-kinase Tie-2. L'angiopoïétine 1 stimule l'activité tyrosine-kinase de ce récepteur, tandis que l'angiopoïétine 2 l'inhibe. L'angiopoïétine 1 régule l'adhésion cellulaire, l'angiopoïétine 2 provoque une disruption du capillaire aboutissant soit à une régression vasculaire en l'absence de facteur de croissance tels que le VEGF, soit au contraire à une néo-angiogenèse lorsqu'il existe une concentration locale suffisante de VEGF ou de FGF. Les ARPs partagent avec les angiopoïétines une homologie structurale : présence d'un peptide signal permettant leur sécrétion, d'un domaine coiled-coil permettant l'oligomérisation et d'un domaine de type fibrinogène favorisant la liaison au récepteur. Toutefois, les ARPs ne se lient pas à Tie2 et Tie1. Certaines ARPs, telle ANPTL-3, ont à la fois un effet sur le métabolisme lipidique et l'angiogenèse. ANGPTL-3 est exprimée au niveau hépatique, et est régulée par

le facteur de transcription nucléaire LXR dont le ligand est l'oxystérol. ANGPTL-3 se lie à l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  et exerce une double fonction : régulation du métabolisme lipidique et angiogénèse (migration des cellules endothéliales *in vitro* et angiogénèse cornéenne *in vivo*). L'importance d'ANGPTL-3 dans le métabolisme lipidique a été montré par les travaux Koishi *et al.* chez la souris KK/san (Nature Genetics, 2002). Ces souris présentent une hypolipidémie. ANGPTL-3 s'est révélée être le gène responsable de ce phénotype par clonage positionnel. La perfusion d'ANGPTL-3 recombinante ou l'administration d'un adénovirus codant pour ANGPTL-3 entraîne chez la souris une élévation des triglycérides, des acides gras non estérifiés et du cholestérol total. Aucun effet n'a été noté sur le métabolisme glucidique.

ANGPTL-4 est un autre exemple d'angiopoïétine impliquée à la fois dans le métabolisme lipidique et l'angiogénèse. ANGPTL-4 a été découverte par J. Yoon *et al.* (Mol. Cell Biol., 2000) et F. Kernstern *et al.* (J. Biol. Chem., 2000). Ces derniers auteurs ont montré que ANGPTL-4 était un gène cible de PPAR $\alpha$  et de PPAR $\gamma$ . ANGPTL-4 est présente dans le tissu adipeux et son expression est accrue au cours du jeûne au niveau du foie, du tissu adipeux et dans le plasma. Des souris *ob/ob* et *db/db* ont une expression accrue d'ANGPTL-4. S. Germain *et al.* (Am J Pathol., 2003) ont par ailleurs montré que ANGPTL-4 était induite par l'hypoxie dans des cellules endothéliales en culture et qu'elle était exprimée dans des conditions d'angiogénèse réactionnelle telles que l'ischémie critique des membres inférieures ou la zone péri-tumorale des cancers. Enfin, ANGPTL-4 exerce un effet angiogénique direct dans la membrane chorioallantoïdienne. Récemment, Bélanger *et al.* (J. Mol. Cell. Cardiol., 2002) ont montré que ANGPTL-4 était induite par l'hypoxie dans les cardiomyocytes. Ainsi se dessine un nouveau chapitre particulièrement prometteur, l'implication de certains des membres de la famille des angiopoïétin-like dans l'angiogénèse et le métabolisme lipidique, ouvrant de façon plus large encore les interactions qui peuvent exister entre le métabolisme intermédiaire et la néo-angiogénèse.

### Rôle des cellules endothéliales dans l'organogénèse

Des travaux revus ci-dessus, il ressort que plusieurs gènes exprimés par les préadipocytes ou les adipocytes peuvent avoir, dans certaines conditions, des propriétés angiogéniques. L'inverse est-il vrai, à savoir les cellules endothéliales pourraient-elles exercer un rôle dans l'organogénèse ? Deux travaux publiés en 2001 semblent l'indiquer. Dans un premier travail, Matsumoto *et al.* (Science, 2001) montrent que l'organogénèse hépatique peut être induite par les angioblastes et les cellules endothéliales. Au cours de l'organogénèse chez la souris, à E9.5, le bourgeon hépatique se forme et des cellules hépatiques migrent dans le mésenchyme du septum transversum. On note aussi le début de la formation de structures vasculaires. Dans des cultures de cellules hépatiques d'embryons dépourvues du récepteur R2 du VEGF (et donc en l'absence de cellules endothé-

liales matures), on observe l'absence d'invasion du septum transversum par les cellules hépatiques. Les angioblastes (ou les cellules endothéliales) pourraient donc jouer un rôle important dans la formation du bourgeon hépatique. Une autre série d'expériences rapportée par Lammert *et al.* (Science, 2001) va dans le même sens. Ces auteurs ont montré que l'endothélium vasculaire induisait l'expression d'insuline dans l'endoderme pancréatique isolé mis en culture et que des embryons dépourvus d'aorte dorsale n'exprimaient pas de gène pancréatique. La transgénèse ciblée du facteur de croissance vasculaire VEGF par Pdx1 (facteur transcriptionnel des cellules pancréatiques) aboutit à la production ectopique d'insuline à partir de cellules exprimant Pdx1 dans l'épithélium. Les vaisseaux sanguins seraient donc capables d'induire ou de favoriser la différenciation du pancréas endocrine. Ces travaux ouvrent donc un chapitre particulièrement intéressant, la possibilité qu'auraient les angioblastes ou les cellules endothéliales primitives de jouer un rôle direct dans l'induction de l'organogénèse.

P. C.

#### RAPPORT D'ACTIVITÉ DU LABORATOIRE

### **I — SYSTÈME RÉNINE-ANGIOTENSINE ET ENDOTHÉLINE. BIOLOGIE DE LA PAROI VASCULAIRE**

Équipe : P. CORVOL, C. HUBERT, C. MONNOT, L. MULLER, M. GERVAIS-TAUREL, A. MICHAUD, A. BARRET, C. DUGOURD, J. PHILIPPE, C. ARDIDIE, C. SOUNDARAMOURTY, E. ÉTIENNE

#### **I-1. Implication des composants du système rénine-angiotensine dans l'hématopoïèse**

L'enzyme de conversion de l'angiotensine I (ACE), dont une partie du gène a été dupliqué au cours de l'évolution, possède deux sites actifs (appelés N et C) qui cependant diffèrent par leur sensibilité au chlore, la préférence de certains substrats et d'inhibiteurs comme le captopril ou le périndopril.

L'AcSDKP, substrat préférentiel du domaine N de l'ACE, semble impliquer dans le contrôle de la prolifération des cellules souches hématopoïétiques. L'une des hypothèses avancées est qu'AcSDKP inhibe l'entrée des cellules souches en phase S. Dans le cas d'un traitement anticancéreux agissant sur le cycle cellulaire, l'administration d'AcSDKP, concomitante à un traitement cytotoxique a été proposée pour maintenir sélectivement les cellules souches hématopoïétiques dans un état quiescent afin de les préserver durant le traitement cytotoxique. Cependant la demi-vie de ce peptide « *in vivo* » n'est que de quelques minutes. Une autre possibilité est d'inhiber le catabolisme de l'AcSDKP par les inhibiteurs spécifiques de l'ACE. Dans un modèle de souris, ayant subi une dose d'irradiation subléthale, l'administration de périndopril a un effet bénéfique sur la survie des

animaux, avec une reconstitution accélérée des plaquettes et des érythrocytes (en collaboration avec l'unité INSERM U362).

Les souris, dont le gène de l'ACE a été invalidé, ont une baisse significative de leur hématoците de plus de 10 %, ainsi qu'une baisse de l'hémoglobine (en collaboration avec le Dept. of Pathology, Emory Univ., Atlanta, USA). Une perfusion d'angiotensine II chez ces souris, rétablit l'hématoците à sa valeur normale, suggérant que l'anémie serait due au manque d'angiotensine II et non à l'accumulation de l'AcSDKP rencontrée chez ces animaux.

Pour déterminer quels sont les composants majeurs du système rénine-angiotensine impliqués dans l'hématopoïèse, une première étude a été conduite dans des lignées cellulaires humaines, plus aisées à obtenir que les cellules normales. Ces cellules tumorales caractérisent un lignage défini dans l'hématopoïèse. L'ACE ne semble être exprimée que dans les lignées myéloïdes alors que le récepteur de l'angiotensine II (AT1) n'est exprimé que dans certaines lignées de type mégacaryocytaire-érythroblastique. Actuellement nous étudions les composants du système rénine-angiotensine au cours des stades de différenciation des cellules progénitrices humaines de la lignée myéloïde. Ceci nous permettra de déterminer les molécules impliquées lors de la différenciation de l'hématopoïèse et d'étudier leurs mécanismes d'action.

L'obtention par recombinaison homologue, de souris n'ayant qu'un des deux sites catalytiques actifs de l'ACE pourra également déterminer l'importance relative de l'AcSDKP (substrat hautement spécifique du domaine N) et de l'angiotensine II lors de la différenciation hématopoïétique. Deux vecteurs de recombinaison ont été construits pour inactiver respectivement les sites N et C de l'enzyme. Dans les deux cas, les deux histidines du site catalytique ont été remplacées par deux lysines qui ne lient plus l'atome de zinc nécessaire à la catalyse. Des souris dont le site N a été invalidé viennent d'être générées par l'équipe du Dr K. Bernstein (Emory University, Atlanta, USA) avec lequel nous collaborons. Ces souris, dont le taux d'AcSDKP est élevé, vont être irradiées selon le protocole préalablement cité, pour évaluer leur taux de survie, conséquence directe d'une reconstitution hématologique plus ou moins prononcée. Ces résultats permettront de dissocier les effets relatifs de l'AcSDKP et de l'angiotensine II sur ces souris et ainsi envisager la signalisation de l'effet.

L'établissement de ces deux lignées de souris n'ayant qu'un seul des deux sites actifs de l'ACE sera un excellent modèle pour connaître également le rôle respectif de chaque domaine dans le métabolisme de l'angiotensine et de la bradykinine, le développement rénal ainsi que le rôle de l'ACE dans le contrôle de la fertilité chez la souris mâle.

## **I-2. L'Enzyme de conversion de l'endothéline**

L'enzyme de conversion de l'endothéline (ECE) assure la biosynthèse des endothélines à partir de leur précurseurs. Ces peptides régulent les systèmes

cardiovasculaires et neuroendocrines par des mécanismes autocrines et paracrines. Les expériences d'inactivation des gènes codant pour l'ECE mettent en évidence l'importance de la biosynthèse locale de ces peptides. Par ailleurs, l'ECE est capable d'assurer l'activation des endothélines aussi bien au cours du processus sécrétoire que dans le milieu extracellulaire. Le contrôle local de la biosynthèse des endothélines par l'ECE joue donc un rôle fondamental dans la régulation du système endothélinergique. D'autant plus qu'il existe plusieurs isoformes de cette enzyme qui possèdent la même activité catalytique mais des profils d'expression spécifiques. La caractérisation des sites d'activité de ces enzymes est donc importante pour l'analyse du système endothéline et pour la mise au point d'inhibiteurs permettant le contrôle de ce système.

La distribution tissulaire de l'ECE et la distribution subcellulaire de ses isoformes suggèrent des fonctions multiples de ces enzymes. Nous nous intéressons donc au rôle de la distribution subcellulaire dans la régulation du système endothélinergique et à la mise en évidence de nouvelles fonctions de ces enzymes.

#### *I-2.1. Régulation du système endothéline par les isoformes de l'ECE*

Nous avons mis en évidence la présence d'ECE au niveau de la membrane plasmique, ainsi que la concentration de certaines isoformes dans le système endosomal. Nous avons pu montrer que les isoformes d'ECE-1 sont capables de former des hétérodimères entre elles et que les signaux d'adressage présent sur les isoformes intracellulaires sont capables de jouer un rôle régulateur en provoquant l'internalisation de l'ECE présente à la membrane plasmique. Cette internalisation de l'enzyme entraîne une perte de biosynthèse extracellulaire des endothélines. Nous poursuivons ces travaux en étudiant l'interaction entre l'ECE-1 et d'autres enzymes de la même famille (ECE-2 et XCE).

Par ailleurs, l'analyse du trafic intracellulaire des deux isoformes présentes à la membrane plasmique, notamment par des approches de FRAP (fluorescence recovery after photobleaching), a montré qu'une de ces deux isoformes présente des caractéristiques d'internalisation et de recyclage rapides et régulées par la PI3 kinase. Nous complétons ces travaux par l'identification de protéines associées aux domaines cytosoliques des ECE. Ces protéines seraient responsables de la spécificité de localisation des isoformes et de la régulation du trafic de certaines d'entre elles. Elles seront identifiées par des approches biochimiques basées sur l'interaction *in vitro* de domaines cytosoliques recombinants avec des extraits de cellules endothéliales. Ces interactions seront analysées en gels bidimensionnels suivis de spectroscopie de masse.

#### *I-2.2. Nouvelles fonctions de l'ECE*

La présence d'ECE dans les endosomes suggère de nouvelles fonctions pour cette endopeptidase, dans la mesure où, d'une part, son substrat principal, la big-endothéline, n'est pas présent dans les endosomes, et, d'autre part, ces comparti-

ments intracellulaires sont associés à une activité de dégradation et non de biosynthèse de peptides. La capacité de l'ECE-1 à dégrader certains peptides tels que la bradykinine ou la substance  $\beta$ -amiloïde a d'ailleurs été décrite. En collaboration avec le Dr Lakshmi Devi, de l'École de Médecine du Mount Sinai à New York, nous entreprenons l'analyse de la maturation et de la dégradation d'une librairie de précurseurs et de peptides afin d'identifier de nouveaux substrats des ECE-1 et 2.

#### *Fonction de l'activité intracellulaire de l'ECE-1 dans l'endocytose*

La balance entre l'activation et la dégradation des peptides vasoactifs permet une régulation complexe du système cardiovasculaire. La dégradation de la bradykinine par l'ECE-1 a été décrite récemment. Cette interaction entre le système endothélinergique et la bradykinine pourrait se faire d'une part dans un contexte extracellulaire semblable à celui de la dégradation de la bradykinine par l'enzyme de conversion de l'angiotensine. D'autre part, la dégradation de ce peptide dans des compartiments d'endocytose pourrait constituer un nouveau type de régulation de la signalisation par la bradykinine. Nous étudions l'importance physiologique de cette voie de signalisation en collaboration avec le laboratoire du Pr Alhenc-Gelas (U367).

#### *Fonction de l'activité intracellulaire de l'ECE-1 dans la transcytose endothéliale.*

Certaines des structures d'endocytose contenant l'ECE dans les cellules endothéliales sont également marquées par la cavéoline-1. Cette protéine est spécifique des cavéoles et des cavéosomes, compartiments qui sont responsables de la perméabilité vasculaire par transcytose. La fonction d'une endopeptidase telle que l'ECE dans ces structures n'a pas encore été décrite. Elle pourrait constituer une étape importante de la régulation de la diffusion de certains peptides de la circulation vers les tissus. Afin de tester cette hypothèse, nous analyserons la transcytose de substrats identifiés précédemment dans un modèle de cellules endothéliales cultivées sur filtre reconstituant les conditions de perméabilité vasculaire *in vitro*.

### **I-3. Les voies de signalisation intracellulaires impliquées dans le remodelage vasculaire — Rôle des voies PI3K/Akt et ERK1/ERK2**

Ce projet de recherche consiste en l'étude des mécanismes moléculaires et physiologiques mis en jeu dans la régulation du modelage et remodelage vasculaire, articulée autour de deux axes :

*I-3.1. Implication de la voie de signalisation intracellulaire PI3K/Akt du récepteur de type 1 de l'angiotensine II (AT<sub>1</sub>) dans les réponses prolifératives au cours des processus de remodelage vasculaire*

L'Angiotensine II (AngII) participe au remodelage vasculaire associé aux maladies cardiovasculaires prolifératives, comme l'athérosclérose et la resténose post-angioplastie, en favorisant la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV) par l'intermédiaire du récepteur membranaire couplé aux protéines G, le récepteur AT<sub>1</sub>. Parmi les mécanismes moléculaires impliqués dans cet effet mitogénique, nous avons identifié la voie de signalisation de la PI3K (phosphoinositide 3-kinase) et de la sérine/thréonine kinase Akt, en cellules CHOAT1 et en CMLV. Dans ces deux modèles cellulaires, l'activation de la voie endogène PI3K/Akt en réponse à l'AngII s'effectue indépendamment de celle de la cascade des ERK1 et ERK2. De plus, la stimulation de ces deux voies est nécessaire à la prolifération cellulaire induite par l'AngII.

S'il est aujourd'hui clairement établi que l'activation de l'Akt par les facteurs de croissance passe par son recrutement à la membrane et sa phosphorylation sur deux résidus, les localisations subcellulaires de l'Akt active, indispensables à son action physiologique, restent à définir. Le premier objectif de cette partie expérimentale a été de définir la cinétique de migration cellulaire de l'Akt en réponse à l'AngII et de corrélérer les localisations subcellulaires de l'Akt active avec les réponses prolifératives induites par l'AngII.

*Localisation subcellulaire de l'Akt en réponse à l'AngII*

Cette approche a été réalisée dans un premier temps sur des cellules CHOAT1 exprimant de façon stable l'Akt1 humaine étiquetée avec l'épitope HA. Après stimulation par l'AngII, les mouvements cellulaires de l'Akt totale et/ou de sa forme active ont été évalués par microscopie confocale, indiquant que l'Akt après stimulation du récepteur AT<sub>1</sub> est rapidement transloquée du cytosol vers la surface membranaire, l'adressage rapide de l'Akt à la membrane s'accompagnant d'une phosphorylation de l'Akt dès la troisième minute après stimulation. Cependant, l'étude de la localisation de l'Akt active en réponse à une stimulation d'une heure ou plus n'a pas montré de translocation nucléaire de l'Akt et ce quelque soit son niveau d'expression. Des transfections transitoires d'HA-Akt réalisées dans d'autres types cellulaires ont confirmé l'absence d'Akt activée par l'AngII dans le noyau. Enfin, ces données ont été complétées par une approche biochimique sur ces mêmes cellules, non transfectées par l'Akt. Au vue de ces résultats, nous pouvons conclure que la présence d'Akt active dans le noyau, contrairement aux ERK1/2, n'est pas nécessaire à la réponse proliférative.

*Conséquence de la surexpression de l'Akt sur la prolifération cellulaire induite par l'AngII*

Notre second objectif a été de caractériser précisément le phénotype prolifératif des cellules CHOAT1 surexprimant de façon stable l'HA-Akt. Nos résultats

montrent clairement une diminution de la réponse proliférative dépendante du niveau croissant d'expression de l'Akt. Hixon *et al.* (2000) a montré que l'Akt1 régule le niveau de ploïdie dans les CMLV et contribue à la polyploïdie et l'hypertrophie observées au cours de l'hypertension. Le profil phénotypique des différents clones exprimant des niveaux variés d'HA-Akt1, est donc analysé par l'incorporation de leucine tritiée, marqueur d'hypertrophie. La ploïdie des cellules ainsi que l'évolution de leur contenu en ADN au cours du cycle cellulaire seront déterminés prochainement par cytométrie de flux. Enfin, les niveaux et les cinétiques de phosphorylation et d'activation de l'AKT sont en cours d'analyse pour tous les clones exprimant l'Akt recombinante. Les premiers résultats confirment la corrélation entre l'expression croissante de l'Akt phosphorylée et activée par l'AngII et l'inhibition de la réponse proliférative induite par l'AngII.

*Caractérisation des mécanismes moléculaires impliqués dans l'inhibition de la réponse proliférative par l'Akt*

Le troisième objectif de ce projet est de comprendre les mécanismes mis en jeu lors de la surexpression de l'Akt et qui aboutissent à l'inhibition de la réponse proliférative induite par l'AngII. Notre hypothèse repose sur un rôle déterminant de l'Akt qui module de façon directe ou indirecte la capacité des ERK1/2 à transmettre un signal mitogénique. Cette hypothèse est confortée par l'étude récente de Galetic *et al.* (2003) montrant que l'Akt surexprimée est capable d'interférer avec les ERK1/2 en diminuant leur activité. Dans ce contexte, nous étudions si l'inhibition des ERK1/2 est corrélée au niveau d'expression croissant de l'Akt recombinante.

De plus, la contribution des ERK1/2 dans la réponse proliférative induite par l'AngII est appréciée grâce à l'analyse du rôle de la protéine PEA-15 (phosphoprotéine enrichie dans les astrocytes, d'un poids moléculaire de 15 kDa) dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe d'Hervé Chneiweiss (INSERM U114). Cette protéine lie ERK1/2 sans modifier la phosphorylation de ces kinases, et localise leur activité dans le cytoplasme grâce à un export nucléaire permanent. Des lignées de cellules CHOAT1 exprimant de façon stable PEA-15 humain étiqueté avec la protéine fluorescente GFP ont été établies. La surexpression de PEA-15 entraîne une absence de ERK1/2 nucléaire et une abolition de la réponse proliférative induite par l'AngII. Les analyses sont actuellement en cours afin de vérifier si l'inhibition de l'activité mitogénique, corrélée à une relocalisation des ERK1/2 du noyau vers le cytosol, fait intervenir des mécanismes semblables dans les cas de surexpression d'Akt et de PEA-15.

Ce travail permettra une meilleure compréhension des interactions moléculaires entre la voie PI3K/Akt et la cascade des MAPK ERK1/2 ainsi que des conséquences physiopathologiques de la surexpression de l'Akt dans la genèse de l'hypertension artérielle. Ces mécanismes d'interactions fonctionnelles, encore mal connus, doivent être clairement disséqués afin de mieux connaître les régula-

tions mises en jeu dans de nombreuses pathologies présentant de hauts niveaux d'expression de l'Akt, de l'hypertension artérielle à certains cancers.

### *I-3.2. Analyse structure-fonction de la protéine Angiopoïétin-like 4 en cellules endothéliales et cellules musculaires lisses vasculaires*

Ce thème de recherche est réalisé en collaboration avec l'équipe du Dr Stéphane Germain, dans le cadre de la recherche de nouveaux acteurs de l'angiogénèse hypoxique/ischémique. Cette équipe a cloné la protéine Angiopoïétin-like 4 (ANGPTL4) par criblage différentiel entre ARN messagers de cellules microendothéliales humaines (HMEC-1) soumises à une hypoxie ou cultivées en normoxie. Cette collaboration s'articule autour de deux axes.

#### *Recherche de protéines interagissant avec ANGPTL4 au niveau des cellules cibles vasculaires ou de leur matrice extracellulaire*

ANGPTL4 étant une protéine sécrétée, ses sites d'action peuvent être distincts de ses sites d'expression et peuvent impliquer des interactions éventuelles avec les intégrines présentes à la surface de cellules cibles ou avec des constituants de la matrice extracellulaire. Cette interaction pourrait soit faciliter l'action sur les cibles cellulaires soit favoriser une forme de stockage de la protéine. Nos résultats en immunoblot et microscopie confocale montrent une interaction forte d'ANGPTL4 recombinante ou endogène avec la matrice extracellulaire de diverses cellules dont les HMEC-1. Le but de ce projet sera donc d'identifier le ou les composants de la matrice extracellulaire responsable de cette interaction.

#### *Recherche des domaines fonctionnels d'ANGPTL4*

ANGPTL4 comme les autres angiopoïétin-like possède un domaine coiled-coil N-terminal et un domaine fibrinogène-like C-terminal. Le rôle spécifique de ces deux domaines fonctionnels dans les interactions protéine-matrice, protéine-cellules, dans la transduction du signal ou dans l'activité biologique sera testé. Il semble en effet intéressant de considérer particulièrement le domaine fibrinogène-like : il est nécessaire à l'activation du récepteur Tie2 par l'angiopoïétine 1, il permet l'interaction d'ANGPTL3 avec les intégrines.

Des surexpressions stables (CHO, HEK) ou transitoires (COS7) de la protéine ANGPTL4 étiquetée avec divers épitopes ont été réalisées. La protéine a été étiquetée avec un double épitope C-terminal myc-polyhistidine permettant une reconnaissance de la protéine grâce à l'anticorps anti-myc et une purification par chromatographie d'affinité polyhistidine/ion métal divalent. Une protéine ANGPTL4 recombinante couplée à la GFP a été également produite afin de pouvoir visualiser directement la protéine à la surface des cellules.

Quelles que soient les lignées cellulaires productrices, deux bandes spécifiques de 35 et 50 kDa sont détectées par immunoblot dans les milieux conditionnés et

correspondent à deux formes sécrétées d'ANGPTL4 ; de plus, la forme associée à la matrice extracellulaire est la forme longue de 50 kDa.

Le marquage métabolique de la protéine et la mutation de sites de clivages potentiels (notamment un site furine-like N-terminal) aideront à préciser la genèse de la forme courte. À terme son séquençage et sa production en cellules eucaryotes permettront de tester son activité intrinsèque. ANGPTL4 recombinante de forme longue ou courte sera donc appliquée sur les cellules vasculaires soit sous forme purifiée soit issue de milieu conditionné afin d'identifier la réponse cellulaire en terme de prolifération, apoptose, formation de tubes capillaires et les voies de signalisation ERK1/2 et PI3K/Akt.

Ce travail permettra de mieux connaître les régions fonctionnelles de cette protéine pouvant être impliquées dans le remodelage vasculaire.

## **II — HORMONES PEPTIDIQUES : ONTOGENÈSE ET RÔLE DANS LE DÉVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE ET L'ANGIOGENÈSE**

Équipe : J.M. GASC, S. GERMAIN, N. LAMANDÉ, E. LARGER, K. SAVARY, G. SINH, S. LE JAN, M.T. MORIN, F. MONGIAT

Dans le cadre du thème général « Angiogenèse embryonnaire et physiopathologique » nos travaux ont plus particulièrement porté sur l'ontogenèse et le rôle probable de deux metalloprotéases à Zinc, l'Enzyme de Conversion de l'angiotensine I (ACE) et l'aminopeptidase N (APN) dans la différenciation hémangioblastique chez l'embryon. Par ailleurs, nous avons mis au point un traitement qui permet de rendre les embryons de poulet hyperglycémiques, en vue d'utiliser ce modèle pour reproduire les lésions vasculaires caractéristiques du diabète. Enfin, les recherches en cours sur le rôle du facteur de transcription EPAS1 (aussi appelé HIF2a), celles sur l'ischémie critique des membres inférieurs et celles sur le rôle anti-angiogénique de l'angiotensinogène, seront rapportées ultérieurement, suivant l'avancement des travaux.

### **II-1. Enzyme de conversion de l'angiotensine I (ACE) et aminopeptidase N (APN) : deux protéases nécessaires pendant le développement embryonnaire précoce ?**

Selon le concept proposé il y a plus d'un demi siècle et qui, grâce aux méthodes modernes d'investigation, a été récemment démontré, les mêmes cellules du mésoderme extra embryonnaire (les « hémangioblastes »), qui forment d'abord des amas indifférenciés morphologiquement, se différencient selon deux voies divergentes très tôt dans le développement : Certaines de ces cellules quittent le centre de ces amas et forment une couche continue de cellules de phénotype endothélial, tandis que les cellules des amas acquièrent un phénotype et des potentialités hématopoïétiques.

Plusieurs facteurs sont déjà connus qui contrôlent la différenciation de ces îlots sanguins à double potentialité. En particulier le VEGF joue un grand rôle dans ce processus. Parce que l'ACE et l'APN, par ailleurs connues pour leur fonction dans le système renine-angiotensine, sont exprimées très tôt dans le développement embryonnaire et avec un patron spatio-temporel d'expression évocateur d'une implication dans les processus précoces de différenciation.

Ce travail a été commencé sur l'embryon de poulet pour tirer profit de la simplicité, et la facilité d'intervention et de manipulation de ce modèle expérimental, mais l'objectif à plus long terme est de mieux comprendre ces mécanismes pendant le développement humain.

### *II-1.1. L'enzyme de conversion de l'angiotensine I (ACE) dans l'hématopoïèse et la vasculogénèse embryonnaire : Quel rôle ?*

Nous étudions le rôle de l'ACE dans le développement vasculaire et la différenciation des cellules sanguines au cours de l'embryogénèse. Cette métalloprotéase à zinc connue pour son rôle dans le système rénine-angiotensine est aussi impliquée dans d'autres systèmes de régulation, mais la place de l'ACE dans la différenciation vasculogénèse/hématopoïèse reste à déterminer. Ces systèmes sont par ailleurs très liés puisqu'ils proviennent d'un même type de cellules mésodermiques. Ces cellules souches peuvent se différencier en cellules endothéliales ou en cellules hématopoïétiques, en fonction de signaux moléculaires encore mal connus. Parmi ces signaux, le VEGF et son récepteur le VEGFR2 jouent un rôle majeur. L'embryon de poulet a été choisi pour commencer une étude du rôle de l'ACE sur la vasculogénèse/angiogénèse et sur l'érythropoïèse.

Par RT-PCR et hybridation *in situ*, nous avons détecté l'ARN messager de l'ACE de poulet, ainsi que la protéine avec un anticorps, dans l'embryon à partir de 24 heures d'incubation (stade 6). Une mesure d'activité enzymatique montre que l'enzyme est active dès ce stade précoce du développement embryonnaire. Sa localisation dans l'endoderme extra-embryonnaire, à proximité des îlots sanguins et en contact direct avec le vitellus qui contient de nombreux peptides, suggère son implication dans le contrôle de l'hématopoïèse ou de l'angiogénèse. Dans le but de déterminer si l'ACE joue un rôle régulateur dans la différenciation des hémangioblastes, plusieurs approches expérimentales sont en cours : (1) caractérisation pharmacologique de l'ACE de poulet avec différents inhibiteurs d'ACE de mammifères, (2) traitements des embryons de poulet avec un inhibiteur de l'ACE selon différents protocoles (dans ou en dehors de la coquille, ou en culture d'embryon), (3) greffe de cellules CHO surexprimant l'ACE recombinante humaine (forme soluble ou forme tronquée) sur la membrane chorio-allantoïdienne de poulet pour tester leur potentiel angiogénique. Une amélioration des techniques est en cours d'expérimentation en vue d'assurer une meilleure reproductibilité des résultats.

### II-1.2. L'aminopeptidase N : rôle dans l'angiogenèse de la membrane chorio-allantoïdienne et dans la différenciation hémangioblastique ?

L'aminopeptidase N (APN) est une métallopeptidase à zinc également connue comme marqueur de différenciation des cellules sanguines de la lignée myéloïde. Exprimée dans de nombreux tissus (épithéliums, rein, système nerveux central...), elle participe, par le métabolisme de plusieurs peptides actifs, à divers processus physiologiques. Récemment, un nouveau rôle, dans l'angiogenèse, a été proposé, basé sur l'expression endothéliale de l'APN restreinte aux vaisseaux en cours d'angiogenèse et sur l'action anti-angiogénique résultant de l'inhibition de l'aminopeptidase N, toutefois réalisée par des inhibiteurs enzymatiques non spécifiques (bestatine).

Nous avons d'abord cherché à établir le rôle angiogénique de l'APN à l'aide d'un inhibiteur très spécifique sur un modèle d'angiogenèse *ex vivo*, la membrane chorio-allantoïdienne (CAM) de l'embryon de poulet. Après avoir montré que l'ARNm et la protéine sont présents dans les vaisseaux de la CAM, et qu'un inhibiteur hautement spécifique bloque l'activité enzymatique de l'APN de poulet *in vitro*, nous avons réalisé entre 8 et 12 jours de développement des traitements de la CAM par cet inhibiteur, avec ou sans co-stimulation angiogénique (bFGF ou hypoxie), et avec des fréquences de traitement variables de 30 minutes à 12 h. Aucun effet anti-angiogénique de l'inhibiteur n'a été observé, ni par analyse macroscopique, ni par traitement informatisé des images du réseau vasculaire. De plus, *in vitro*, l'inhibiteur ne perturbe pas la formation de tubes endothéliaux par des cellules HUVEC cultivées sur Matrigel. Nos résultats avec cet inhibiteur ne confirment donc pas l'implication de l'APN dans l'angiogenèse de la CAM.

L'étude de l'ontogenèse de l'APN au cours du développement embryonnaire du poulet a cependant permis de montrer une expression très précoce de cette enzyme, avec un patron d'expression suggérant une implication dans les processus de vasculogenèse et d'hématopoïèse précoce : l'APN est en effet exprimée dès 24 h de développement dans les îlots sanguins du sac vitellin (sites de vasculogenèse et d'hématopoïèse extra-embryonnaire), et à 72 h de développement dans la région para-aortique (premier site d'hématopoïèse intra-embryonnaire) et les vaisseaux du sac vitellin. Dans le but de déterminer si l'APN est effectivement impliquée dans ces processus, nous avons commencé une étude fonctionnelle de l'implication de l'APN dans la vasculogenèse et l'hématopoïèse précoces. Les conditions de culture d'embryons très jeunes et les modalités du traitement sont en cours de mise au point.

## II-2. Angiogenèse et architecture vasculaire dans les phéochromocytomes

L'angiogenèse est une étape déterminante de la croissance tumorale et il est admis qu'une tumeur ne peut croître au delà de quelques millimètres cube si elle n'est pas irriguée par le sang. Nous sommes intéressés à un type de tumeurs très vascularisées. La question était de montrer quels facteurs de croissance

étaient anormalement exprimés dans ces tumeurs et s'il existait un critère permettant de distinguer un phéochromocytome bénin d'un phéochromocytome malin. De façon inattendue, nous avons observé une différence majeure dans l'architecture vasculaire de ces deux types de phéochromocytomes. La tumeur bénigne présente une vascularisation proche de celle de la surrenale normale, avec un réseau capillaire régulier et uniforme dans tout le tissu tumoral. Le phéochromocytome malin se caractérise par une architecture vasculaire irrégulière présentant de longues formations tubulaires qui, intégrés en trois dimensions ne peuvent correspondre à des vaisseaux mais à des poches ou des sacs de sang délimitant des énormes nodules dépourvus de tout signe de vascularisation à l'intérieur. Nous avons, par hybridation *in situ* suivie d'une estimation semi-quantitative, comparé les niveaux d'expression de ARNm des molécules suivantes impliquées dans l'angiogenèse : Hypoxia-inducible factor  $1\alpha$ , le VEGF et ses récepteurs VEGFR1 et VEGFR2, les angiopoïétines 1 et 2 et le récepteur Tie2, la thrombospondine 1, les endothélines, 1 et 3 et leurs récepteurs ETA et ETB ainsi que leur enzyme de conversion (ECE1). Parmi toutes ces molécules, celles dont l'augmentation est la mieux corrélée avec le caractère malin de la tumeur, on note le récepteur ETB des endothélines, et le facteur de transcription EPAS1 (ou HIF2 $\alpha$ ). Cette différence a été quantifiée par RT-PCR quantitative. Dans les deux cas l'augmentation atteint un facteur de 10 fois. Les observations sur l'architecture vasculaire des phéochromocytomes malins ainsi que la très forte augmentation des ARNm du récepteur ETB, du VEGF et d'EPAS1, fournissent de nouvelles pistes pour établir l'étude des phéochromocytomes malins.

### III — NEUROPEPTIDES CENTRAUX, RÉGULATION HYDRIQUE ET CARDIOVASCULAIRE

Équipe : C. LLORENS-CORTES, N. PICCO, A. HUS-CITHAREL, R. ROZENFELD, S. EL MESSARI, C. FASSOT

Le but de nos travaux est d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques dans le système nerveux central (SNC). La démarche consiste à étudier l'organisation et le rôle fonctionnel d'un système peptidergique donné. Ces études permettent d'identifier les enzymes impliquées dans le métabolisme de ces peptides et les différents sous-types de récepteurs sur lesquels ces peptides agissent. La synthèse de molécules bloquant ces nouvelles cibles et leur évaluation *in vivo* sur les différentes actions biologiques induites par ces peptides ouvrent la voie à une recherche d'agents pharmacologiques originaux.

#### III-1. Objectif 1 — Étude du Système Rénine-Angiotensine (SRA) Cérébral

Travaux antérieurs : Au cours de ces dernières années, nos travaux ont été principalement axés sur l'organisation et le rôle fonctionnel du SRA cérébral. Nous avons montré dans le cerveau que l'aminopeptidase A (APA) et l'amino-

peptidase N (APN), deux ectoenzymes à zinc, étaient respectivement impliquées, *in vivo*, dans la conversion de l'angiotensine II (AngII) en angiotensine III (AngIII) et dans l'inactivation de l'AngIII en angiotensine IV. Une exploration systématique du site actif de l'APA par mutagenèse dirigée et par criblage de banques de pseudopeptides réalisées par chimie combinatoire a permis la synthèse d'inhibiteurs spécifiques et sélectifs de l'APA, inexistantes jusqu'à ce jour, tel un pseudotripeptide  $\beta$ -aminothiol (travaux conjoints entre INSERM U266, équipe de M.C. Fourmié-Zaluski et notre équipe ; Brevet PCT/FR00/00112). En bloquant *in vivo* l'APA et l'APN par des inhibiteurs sélectifs nous avons montré que le peptide effecteur du SRA cérébral était l'AngIII et non l'AngII comme établi à la périphérie. Ces travaux ont mis en évidence que l'AngIII cérébrale exerce un effet stimulateur tonique dans le contrôle central de la pression artérielle (PA) chez le rat hypertendu. Ainsi, l'injection centrale et non systémique des inhibiteurs de l'APA, diminue la PA chez le rat spontanément hypertendu (SHR) vigile. Ces résultats suggèrent que l'APA cérébrale pourrait constituer une nouvelle cible thérapeutique pour le traitement de l'hypertension artérielle (HTA) et justifie le développement d'inhibiteurs spécifiques et sélectifs de l'APA, capables de traverser la barrière hémato-encéphalique comme antihypertenseurs centraux (Brevet PCT/FR9900059).

Notre programme de recherche a consisté à effectuer une étude structure-fonction de l'APA, afin de synthétiser des inhibiteurs spécifiques et sélectifs de cette enzyme, capables de passer la barrière hématoencéphalique. Ces molécules ont ensuite été évaluées *in vitro* pour déterminer leur pouvoir inhibiteur sur l'APA purifiée puis *in vivo* après injection par voie intraveineuse ou orale, dans différents modèles d'HTA expérimentale.

### III-1.1. Étude structure-fonction de l'aminopeptidase A.

#### Construction d'un modèle 3D de l'APA

La récente résolution de la structure cristallographique de la LTA4 hydrolase représente la première structure 3D d'une aminopeptidase monozinc. La structure du site actif de la LTA4 hydrolase est en accord avec le rôle des résidus que nous avons caractérisés dans l'APA et le mécanisme catalytique que nous avons proposé. Cette similitude nous a conduit à établir un modèle 3D du site actif de l'APA sur la base de la structure cristallographique de la LTA4 hydrolase en collaboration avec le Dr B. Maigret (UMR, CNRS 7565, Lab. de Chimie théorique). Nous avons effectué une modélisation par homologie de la chaîne protéique comprise entre les résidus 50 et 539 de l'APA. Cette région présente la plus forte conservation de séquence avec la LTA4h. Ce modèle préliminaire a été amélioré par optimisation de son énergie conformationnelle. L'atome de zinc puis l'inhibiteur  $\text{GluPO}_3\text{H}_2$  (analogue de l'état de transition) ont été ajoutés à ce modèle ainsi qu'une couche de molécules d'eau afin de tenir compte d'un effet éventuel du solvant. Ce modèle a ensuite optimisé par minimisation d'énergie et par dynamique moléculaire. Nous avons ainsi obtenu le premier modèle 3D de

l'APA très proche de celui de la LTA4 hydrolase permettant de visualiser de nouveaux résidus, qui semblent importants pour la structure de l'enzyme ou son activité (liaison du substrat, liaison du calcium)<sup>2</sup>.

En combinant ces données structurales et les résultats des études structure-fonction par mutagenèse dirigée, nous pourrions établir le rôle exact de ces résidus. Chaque protéine mutée sera exprimée de façon stable en cellules CHO puis purifiée. Ce modèle permettra de définir un pharmacophore d'inhibiteur de l'APA utile pour la synthèse de nouveaux inhibiteurs.

### *III-1.2. Développement et étude d'inhibiteurs spécifiques et sélectifs de l'aminopeptidase A (APA)*

Au sein d'un partenariat avec les laboratoires Glaxo Smith Kline et l'équipe de M.C. Fournié-Zaluski, nous avons développé de nouveaux inhibiteurs spécifiques et sélectifs de l'APA capables de passer la barrière hématoencéphalique après injection parentérale (Brevets n<sup>os</sup> 0208977 et 0208978). Parmi ces composés, le RB150 inhibe sélectivement l'APA avec une bonne affinité. Injecté par voie intraveineuse chez le rongeur à une dose de 30 mg/kg, il est capable de bloquer l'APA cérébrale. Son degré de pénétration dans le cerveau est de l'ordre de 1,8 %. Dans le cerveau, il bloque non seulement l'activité APA mais aussi la conversion de l'AngII en AngIII. Injecté par voie intraveineuse en doses croissantes, dans un modèle d'hypertension expérimentale dépendante du sel, le rat DOCA-sel, cet inhibiteur induit une baisse de la pression artérielle dose-dépendante en bloquant la formation de l'AngIII cérébrale. Ce modèle se caractérise par une inefficacité des inhibiteurs du SRA systémique et par une rénine basse. Ce modèle est intéressant car le SRA périphérique n'est pas impliqué dans l'élévation de la PA. Ces études montrent qu'un inhibiteur de l'APA a un effet anti-HTA, du fait de l'inhibition du SRA central.

## **III-2. Objectif 2 — Interaction de l'Ang II/III avec d'autres peptides : Voies de signalisation mises en jeu**

Nous avons récemment étudié la distribution des ARN<sub>ms</sub> des récepteurs AT<sub>1A</sub> et AT<sub>1B</sub>, les deux isoformes des récepteurs AT<sub>1</sub> de l'angiotensine chez les rongeurs, le long du néphron de rat par RT-PCR. Les différents segments expriment majoritairement les ARN<sub>ms</sub> du récepteur AT<sub>1A</sub>, à l'exception du glomérule où les ARN<sub>ms</sub> des deux isoformes sont exprimés en quantité similaire. La stimulation de AT<sub>1A</sub> et AT<sub>1B</sub> par l'Ang II/III active la mobilisation du calcium intracellulaire avec la même efficacité<sup>3</sup>. Nous nous sommes plus particulièrement intéressés à la branche large ascendante corticale (CTAL) qui exprime presque exclusivement les ARN<sub>ms</sub> du récepteur AT<sub>1A</sub>. Nous avons mis en évidence dans ce segment que l'Ang II/III, via AT<sub>1A</sub>, médie des augmentations de calcium intracellulaire dépendantes de l'activité de plusieurs enzymes telles que la tyrosine kinase, la protéine kinase C (PKC), mais aussi la phosphatidyl 3-kinase qui induit une

régulation concertée de la  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  et du cotransporteur  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$  via la PKC. Bien que le CTAL ne contienne qu'un seul type cellulaire, il est soumis à de multiples régulations hormonales, telles que la vasopressine et la bradykinine via le récepteur  $\text{B}_2$ .

Projet : Il a été montré que les récepteurs  $\text{AT}_1$  et  $\text{B}_2$  sont capables de s'hétérodimériser. Dans le CTAL, l'AngII/III (via  $\text{AT}_{1A}$ ) stimule le transport de sodium, alors que la bradykinine (via  $\text{B}_2$ ) l'inhibe. Le CTAL est donc un modèle « *ex vivo* » qui nous permettra d'approfondir ce type de régulation, notamment en regardant si différentes isoformes de PKC sont impliquées au cours de la stimulation par l'Ang II/III ou la bradykinine.

### III-3. Objectif 3 — Recherche de ligands endogènes de récepteurs orphelins présents dans le SNC

Travaux antérieurs : Au cours des travaux que nous avons réalisés sur la distribution cérébrale et l'identification du type cellulaire exprimant les récepteurs de l'AngII/AngIII, nous avons développé un nouveau procédé de criblage pour l'identification de ligands endogènes de récepteurs orphelins mettant à profit la propriété qu'ont les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) à s'internaliser sous l'action de ligands agonistes. Cette méthode consiste à 1/ étiqueter un récepteur orphelin avec la protéine autofluorescente EGFP et l'exprimer à la surface de cellules eucaryotes ; 2/ mettre ces cellules en contact avec des fractions HPLC purifiées d'un extrait tissulaire ; 3/ visualiser en microscopie confocale l'internalisation du récepteur fluorescent. Il est possible d'isoler et purifier la fraction contenant le ligand peptidique et de séquencer celui-ci. (Brevet PCT/FR 00/00113 en coll. avec A. Beaudet, Montréal Inst. McGill et H. Vaudry, INSERM U413, Contrat de licence avec la Société Neuro 3D N° 98210B10). Nous avons validé ce procédé sur le récepteur de la neurotensine.

Notre projet de recherche consiste à appliquer ce procédé à la recherche de ligands endogènes de GPCRs orphelins (4 récepteurs orphelins sont actuellement à l'étude), localisés dans le SNC et présentant une similarité de séquence avec des récepteurs de neuropeptides déjà connus. Ce travail fait l'objet d'une Alliance avec l'unité Inserm U413 et l'Institut de Recherche SERVIER.

### III-4. Objectif 4 — Étude d'un nouveau neuropeptide, l'apéline et de son récepteur

Contexte international et travaux antérieurs : La recherche de ligands endogènes de RCPG orphelins, nous a conduit à isoler l'homologue murin du récepteur orphelin humain APJ. Le ligand endogène de ce récepteur a été isolé fin 1998. Il s'agit d'un peptide de 17 acides aminés, l'apéline 17 ou K17F, issu d'un large précurseur la préproapéline composé de 77 acides aminés.

K17F :  $\text{NH}_2\text{-Lys-Phe-Arg-Arg-Gln-Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys-Gly-Pro-Met-Pro-Phe-COOH}$ .

Nous avons montré récemment que ce peptide est présent dans le cerveau humain et murin et qu'il intervient dans la régulation de l'équilibre hydrique. Vu les fonctions de ce récepteur, il devient important de développer de façon rationnelle des agonistes ou antagonistes de ce récepteur, qui permettront d'approfondir le rôle physiologique de l'apéline.

#### *III-4.1. Études structure-fonction du récepteur de l'apéline*

Relation entre la structure et l'activité de différents ligands peptidiques sur le récepteur de l'apéline : Nous avons comparé la capacité de différents fragments d'apéline à se lier sur son récepteur, à modifier la production d'AMPc (second messenger du RCPG de l'apéline) et à induire l'internalisation de ce récepteur. Ceci a permis de définir dans la séquence de K17F, que l'arginine en position 6, la méthionine en position 15 et la phenylalanine en position 17 jouent un rôle important dans la reconnaissance et l'activation du récepteur de l'apéline, premiers pas vers la synthèse d'un analogue non dégradable ou d'un antagoniste de ce récepteur (coll. avec le laboratoire d'H. Vaudry, INSERM U413). Le test (liaison sur le récepteur de l'apéline) se fera à partir d'une chimiothèque de 2 000 composés et sera effectué en collaboration avec la Société Euroclide.

#### *III-4.2. Identification du fragment d'apéline produit in vivo : Développement d'un dosage radioimmunologique (RIA) de l'apéline et analyse de l'immunoréactivité de l'apéline cérébrale*

Afin de caractériser l'anticorps polyclonal dirigé contre K17F que nous avons produit chez le lapin, un RIA a été développé. Les résultats montrent que l'affinité de l'anticorps pour K17F est de  $3.10^{-10}$  M. Cet anticorps est très sélectif puisque dans la séquence de K17F, 3 sites de reconnaissance sont détectés par l'anticorps : un premier au niveau des 4 premiers résidus de K17F, un second au niveau de l'arginine en position 6 dans K17F, un troisième au niveau de la phenylalanine située à l'extrémité C-terminale de K17F. Par ailleurs cet anticorps ne reconnaît pas d'autres neuropeptides comme l'AngII/III, la vasopressine ou le neuropeptide Y. L'immunoréactivité apéline a été étudiée dans différentes régions du cerveau de rat. Les taux d'immunoréactivité apéline les plus élevés sont trouvés dans l'hypophyse et la glande pinéale. La distribution dans le cerveau est hétérogène, l'hypothalamus étant la région la plus riche. Cette localisation suggère que l'apéline pourrait avoir un rôle dans la régulation de l'axe neuroendocrinien et des rythmes circadiens. Par ailleurs, nous avons détecté un taux élevé d'apéline circulante dont l'origine reste à déterminer.

La nature de l'immunoréactivité mesurée a été identifiée en mesurant l'immunoréactivité apéline dans les fractions d'extraits de tissu obtenus après séparation par HPLC, et en identifiant à quels fragments d'apéline correspondaient les pics immunoréactifs. Nous avons observé que la majorité de l'immunoréactivité mesurée dans le cerveau, l'hypothalamus et le plasma correspondait au fragment d'apéline 13 (pE13F) et à un degré moindre à K17F (coll. INSERM U413).

Cet anticorps présente une forte spécificité pour les fragments d'apéline. Il offre l'avantage de ne reconnaître que les fragments d'apéline biologiquement actifs (K17F et pE13F) et n'interagit pas avec les fragments inactifs (R10F ou G5F).

#### *III-4.3. Rôle physiologique de l'apéline*

Distribution de l'apéline et de son récepteur dans le SNC : Dans le cerveau murin, il n'existe que des études succinctes d'hybridation *in situ* de l'ARNm de la préproapéline et d'immunocytochimie du récepteur de l'apéline. Nous avons réalisé une distribution détaillée des neurones apélinergiques dans le cerveau de rat adulte. Les corps cellulaires de ces neurones sont présents principalement dans l'hypothalamus (noyau supraoptique, noyau paraventriculaire, noyau arqué) et dans la medulla ventrolatérale. Les terminaisons de ces neurones ainsi que l'ARNm du récepteur de l'apéline sont retrouvées dans régions cérébrales (région préoptique, hypothalamus, hippocampe, substance noire, noyau du tractus solitaire). Nous avons commencé à entreprendre la distribution de l'apéline et de son récepteur dans le cerveau humain de sujets sains (collaboration avec le Pr Palkovits). Nous envisageons par la suite, en fonction des données obtenues et des moyens disponibles, d'étudier cette distribution sur des cerveaux de personnes décédées et atteintes par le virus du SIDA afin d'évaluer si les régions lésées sont celles qui expriment les récepteurs ou les neurones apélinergiques.

Rôle de l'apéline dans le contrôle de la PA : L'apéline et son récepteur sont présents dans les mêmes structures que celles qui expriment l'AngII/III et leurs récepteurs, ce qui suggère que l'apéline pourrait être impliquée dans le contrôle de la PA. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons évalué les effets centraux et périphériques de différents fragments d'apéline sur la PA chez le rat normotendu WKY anesthésié et le rat spontanément hypertendu vigile. Alors que K17F et l'apéline 13 (pE13F) sont inactifs injectés par voie intracérébroventriculaire, injectés par voie intraveineuse, ils entraînent une baisse de la pression artérielle ( $-11,5 \pm 0,9$  mmHg) compensée par une augmentation de fréquence cardiaque ( $15,3 \pm 5,7$  bpm). L'injection des fragments p10F et G5F, inactifs sur l'internalisation et la signalisation ne modifie pas les variables cardiovasculaires.

#### *III-4.4. Rôle de l'apéline sur l'activité des neurones vasopressinergiques*

Nous avons tout d'abord montré par double marquage : 1) en collaboration avec le Pr A. Beaudet (Institut Mc Gill, Montréal, Canada) que l'apéline était colocalisée avec la vasopressine dans les neurones magnocellulaires du noyau supraoptique (SON) et du noyau paraventriculaire, 2) que les récepteurs de l'apéline étaient synthétisés dans les neurones vasopressinergiques du SON, 3) que l'apéline injectée par voie centrale inhibait la libération de vasopressine basale ou induite par la déshydratation, 4) qu'après une déshydratation, les taux d'apéline sont augmentés dans l'hypothalamus et diminués dans le plasma. À l'inverse

les taux de vasopressine sont diminués dans l'hypothalamus et augmentés dans le plasma. Ces données suggèrent une régulation croisée entre l'apéline et la vasopressine, et soulignent l'implication de ce nouveau neuropeptide dans la régulation du métabolisme hydrosodé. Selon l'état d'hydratation de l'animal, l'activité des neurones magnocellulaires dépendrait non seulement de la proportion intracellulaire de ces 2 peptides mais aussi du rétrocontrôle que ces peptides libérés pourraient exercer sur leur propre synthèse et libération via leurs auto-récepteurs.

#### **IV — GÉNÉTIQUE ET CLINIQUE DE L'HYPERTENSION ARTÉRIELLE**

Équipe : X. JEUNEMAÎTRE, G. BEAURAIN, J. HADCHOUEL, A.P. GIMENEZ-ROQUEPLO, A.M. HOUOT, C. DELALOY, G. DE ARRIBA ZERPA

L'hypertension artérielle (HTA) représente l'exemple même d'une maladie complexe, soumise à de multiples facteurs génétiques et environnementaux divers. Une des particularités des approches que nous mettons en œuvre est la complémentarité entre les équipes clinique et génétique de l'Hôpital Européen Georges Pompidou (HEGP) et celles travaillant au sein de l'Unité 36. Nous avons pu, au cours des 4 dernières années, poursuivre notre effort de collection de familles avec HTA essentielle et secondaire, de collection de tumeurs de la surrénale, de même que focaliser une partie de nos études sur des formes rares héréditaires d'HTA. Une des découvertes importantes est l'identification de 2 gènes (WNK1 et WNK4) appartenant à une nouvelle famille de sérine/thréonine kinases, comme impliqués dans l'hypertension artérielle hyperkaliémique familiale. Une grande partie des activités et des projets de l'équipe est maintenant tournée vers l'étude de la régulation de l'expression de ces gènes *in vitro* et *in vivo*, la création de modèles animaux transgéniques, la recherche de partenaires. Le deuxième axe de notre équipe concerne la susceptibilité génétique aux phéochromocytomes, tumeurs de la médullosurrénale entraînant des hypertensions artérielles sévères et paroxystiques. Nous avons mis en évidence les relations entre gènes du complexe II mitochondrial (SHDH, SHDB) dont la mutation perte de fonction (abolition d'activités enzymatiques) favoriserait l'angiogénèse et la tumorigénèse. Nous avons mis en place un réseau national sur les paragangliomes et initié plusieurs stratégies de recherche.

##### **IV-1. Rôle de WNK1 et WNK4 dans l'hypertension artérielle**

Le projet est axé sur l'Hypertension Hyperkaliémique Familiale (HHF), encore appelée syndrome de Gordon ou pseudohypoaldostéronisme de type II (PHA2), une forme autosomique dominante d'HTA. En 1997, l'étude par une équipe américaine de huit familles atteintes a permis d'identifier 2 régions à l'origine du trait sur les chromosomes 1 et 17, dont au moins une correspond également à une région identifiée dans l'HTA essentielle humaine. Nous avons caractérisé

plusieurs familles françaises, confirmé la transmission autosomique dominante de la maladie, montré les liens entre les anomalies métaboliques (hyperkaliémie, hyperchlorémie, acidose métabolique) mais l'apparition plus tardive de l'hypertension artérielle et identifié un nouveau locus appelé PHA2-C (chr 12p13) à partir d'une grande famille originaire du Nord de la France. Nous avons pu collecter plus de 20 familles et montré une grande variabilité intrafamiliale mais aussi interfamiliale du phénotype. Parallèlement à ce travail, nous avons poursuivi l'analyse moléculaire du locus PHA2-C par analyse de cartographie physique et génétique. En collaboration avec le laboratoire de RP Lifton (Yale, USA), focalisée sur l'étude du même locus à partir d'une seule famille atteinte, nous avons finalement identifié une délétion de 22 Kbp dans l'intron 1 du gène d'une kinase, WNK1, délétion incluse dans la délétion de 41 Kbp retrouvée dans la famille américaine, et dont nous avons pu montrer qu'elle entraînait une surexpression du gène. Parallèlement, l'identification d'homologues de cette kinase, WNK4 au locus PHA2B (chr 17q21), a montré la présence d'autres mutations faux-sens chez d'autres familles atteintes. Ces deux gènes, WNK1 et WNK4, codent une nouvelle famille de sérine/thréonine kinases (with no lysine (K) kinase), famille récemment isolée et donc très peu caractérisée. Les kinases codées par ces gènes sont particulières : la lysine catalytique dans le sous-domaine II du domaine kinase est en effet remplacée par une cystéine. Elles ne semblent pas activer les voies classiques des MAP kinases et leur capacité d'autophosphorylation est influencée par les modifications de concentration ionique extracellulaire : elles pourraient donc être impliquées dans des mécanismes de régulation osmotique de la cellule et intervenir dans une voie de régulation de transporteurs ioniques. Cependant, l'expression ubiquitaire de WNK1 suggère un rôle physiopathologique plus large.

Au cours de l'année 2002 et 2003, nous avons particulièrement étudié la régulation de l'expression *in vitro* du gène WNK1. Ce gène est étendu sur plus de 150 kbp, comprend 28 exons et est à l'origine de deux transcrits d'environ 9.5 et 11 kb. L'expression de ces 2 isoformes est tissu-spécifique. Le transcrit long de WNK1 est préférentiellement exprimé dans le cœur, le muscle squelettique, le testicule et le cerveau, alors que le transcrit court est très largement majoritaire dans le rein, ceci de façon identique chez l'homme et la souris. Nous avons pu mettre en évidence deux promoteurs proximaux à l'origine de 2 transcrits d'expression ubiquitaire, et un promoteur rénal en amont d'un exon d'expression spécifiquement rénale. La présence de deux sites de polyadénylation, et la présence d'épissages alternatifs complète la panoplie des mécanismes à l'origine d'une grande variété de transcrits. Une des découvertes majeures est la présence d'un transcrit rénal sans activité kinase, très fortement exprimé dans le tube contourné distal, qui suggère comme activité principale de cette isoforme, un mécanisme d'interaction avec d'autres protéines (en particulier par le biais de mécanismes d'autoinhibition).

La création d'animaux génétiquement modifiés constitue l'outil indispensable d'analyse moderne de la fonction de ces gènes. Pour WNK1, où l'anomalie

humaine semble être un gain de fonction liée à une surexpression génique, nous réaliserons deux constructions permettant la réalisation par transgénèse classique d'un modèle animal souris surexprimant l'une ou l'autre des isoformes WNK1 dans le tubule distal du néphron. Avec J Hadchouel, nous étudierons la possibilité d'analyse *in vivo* de la régulation de WNK1 chez l'animal entier, avec dans un premier temps l'utilisation de la technologie des BACs (pour disposer de grands fragments d'ADN en amont du gène) et du gène rapporteur nLacZ, marqueur sensible et résolutif. Plusieurs constructions seront utilisées pour reproduire la séquence répresseur de l'intron 1, dont le profil d'expression sera étudié au cours du développement et dans le tissu adulte. Le modèle souris de PHA2 lié à la surexpression de WNK1 sera ensuite créé chez la souris par délétion du ou des élément(s) répresseur(s) identifié(s) dans le génome des cellules ES, injection des cellules ES dans les blastocystes et établissement de lignées murines. Ce projet a été validé par le GIS-Institut des Maladies Rares et sera effectué en collaboration avec l'Institut de la Clinique de la Souris, Strasbourg). Cette étude a obtenu un financement dans le cadre du programme ACI 2001.

L'ensemble de ces projets de transgénèse, devrait permettre d'obtenir un modèle de la pathologie humaine, de corrélérer le niveau d'expression à la sévérité du phénotype, d'apporter des éléments de réponse concernant le rôle de la spécificité tissulaire des deux isoformes de WNK1, et de caractériser les importances relatives de WNK4 et WNK1 dans la régulation du transport ionique et de la pression artérielle et éventuellement de tester l'interaction entre ces 2 gènes.

*Identification d'autres gènes responsables du PHA2* : La collection de familles supplémentaires nous a permis tester la liaison entre les sujets atteints de trois familles et d'exclure les trois loci candidats déjà connus. Nous avons ainsi montré que le PHA2 faisait intervenir au moins un quatrième locus. Nous poursuivrons la caractérisation de plusieurs familles et localiserons le nouveau locus responsable de la maladie. Avec les 4 familles les plus informatives actuellement à notre disposition, une simulation d'étude de liaison montre que les LOD scores maxima attendus sont entre 1.5 et 3.6 pour chacune des familles et un total > 7.0 en cas d'homogénéité génétique. Une analyse de génome entier semble être la plus appropriée à notre objectif, et sera conduite en collaboration avec le Centre National de Génotypage.

## **IV-2. Hypertension artérielle essentielle : Analyse de gènes candidats et relations génotypes-phénotypes**

### *IV-2.1. Collection de familles, analyse de gènes candidats (Dépt. de Génétique, Service d'HTA, CIC, HEGP)*

L'analyse génétique de l'HTA essentielle nécessite de grandes collections d'individus et de familles afin de pouvoir tester l'hypothèse d'effets faibles ou interactifs de gènes de susceptibilité. Nous poursuivrons notre effort unique en

France de collection et de caractérisation de familles hypertendues (> 800 à ce jour). Un effort particulier est effectué pour le recrutement de fratries concordantes et discordantes pour la pression artérielle, avec la participation d'un financement industriel (BMS 2001-3). Un effort est aussi effectué pour le recrutement et la caractérisation clinique et biologique de trios (2 parents, 1 sujet index) dans le cadre d'un contrat CEE du 5<sup>o</sup> PCRDT 2001-3 (Investigateur principal, Pr A. Dominiczak, Glasgow). Pour cette dernière étude, l'analyse génotypique est effectuée au Centre National de Génotypage (Pr M. Lathrop, Évry), après une phase initiale de recherche systématique de polymorphismes sur gènes candidats.

Nous poursuivons également la collaboration entretenue depuis 1994 avec l'équipe du Pr G.H. Williams (Boston, USA) et des Dr S.C. Hunt et P.N. Hopkins (Salt Lake City, USA) pour l'étude phénotypique détaillée de paires de fratries hypertendues avec pour objectif l'étude de relations entre polymorphismes de gènes candidats et des phénotypes intermédiaires impliqués dans la régulation de la pression artérielle (système rénine angiotensine, système kalllicréine-kinine, réponse au sel, sécrétion d'aldostérone, contre-transport Na/Li). Dans le cadre de cette collaboration, plus de 400 individus sur les 3 sites ont maintenant été étudiés. Nous avons pu montrer des relations familiales positives sur la concentration plasmatique de rénine dans des conditions standardisées de régime salé ainsi que sur la réponse de la sécrétion d'aldostérone à la perfusion d'angiotensine II (phénotype de modulation-non modulation), et de l'excrétion de cortisol urinaire. Le polymorphisme M235T du gène de l'AGT est très significativement associé au phénotype de non-modulation. Des relations fortes ont été retrouvées entre la concentration plasmatique de LDL-cholesterol et la réponse tensionnelle à l'administration aigue d'angiotensine II, qui pourrait être en partie médiée par le gène du récepteur de type 1 de l'angiotensine II. Une association significative a été retrouvée entre gène de l'adducine, contre-transport Na/Li et profil plasmatique de rénine.

Nous poursuivons l'étude de gènes candidats et leur relation avec le phénotype : canal Na épithélial sensible à l'amiloride (ENaC) et ses partenaires, Serum Glucocorticoid Kinase (SGK), isoformes de Nedd-4, gènes du système natriurétique (peptides et récepteurs, neutral-endopeptidase).

#### *IV-2.2. Études des gènes WNK1 et WNK4 dans l'HTA essentielle*

Nous rechercherons les SNPs des gènes WNK1 et WNK4 et leur possible association dans l'HTA essentielle, notamment dans des études européennes, en particulier l'étude BRIGHT dirigée par le Pr M. Caulfield (Londres, UK) et contenant plus de 1 500 fratries hypertendues.

#### *IV-2.3. Analyse de relations génotypes-phénotypes (Département de Génétique et CIC, HEGP)*

Deux études originales ont débuté à partir des résultats obtenus au cours des dernières années. La première est une étude de pharmacogénétique effectuée chez

des fratries hypertendues avec l'objectif de déterminer les déterminants de la réponse aiguë et chronique au candésartan, inhibiteur du récepteur de l'angiotensine II. Cette étude, effectuée au CIC de l'HEGP, a prévu d'inclure 30 fratries hypertendues (60 sujets) avec des mesures répétées cliniques et biologiques et permettra l'analyse des éventuelles relations génotypes — réponse médicamenteuse.

La seconde étude, financée par un PHRC 2001-3, concerne l'étude chez le volontaire sain de l'impact des variations interindividuelles de kallikréine sur l'homéostasie hydrosodée, le métabolisme phosphocalcique et le flux artériel endothélium-dépendant. Une relation négative existe entre la pression artérielle et le niveau d'excrétion urinaire de kallikréine dont environ 50 % de la variance est génétiquement déterminée. Des souris K.O. pour la kallikréine rénale possèdent une altération de la vasodilatation flux-dépendant. Dans le cadre d'une collaboration avec l'U367 (F. Alhenc-Gelas), nous avons identifié un polymorphisme (R53H) du gène de la kallikréine rénale, et démontré son impact fort sur l'activité enzymatique de la kallikréine (absence quasi-complète d'activité enzymatique). La poursuite de cette recherche tant au niveau génétique, biochimique et clinique a obtenu un financement du programme ACI en 2000 (F. Alhenc-Gelas, Investigateur principal).

### **IV-3. Étude clinique et génétique de formes secondaires d'hypertension artérielle**

#### *IV-3.1. Phéochromocytomes et Hyperaldostéronismes primaires*

Le phéochromocytome est une cause rare d'HTA secondaire. Plusieurs gènes sont connus pour être impliqués dans le déterminisme génétique dans des pathologies familiales avec parfois phéochromocytome (*Ret*, *VHL*, *NF1*) mais leur contribution dans le phéochromocytome sporadique est faible. Récemment, 2 gènes codant pour deux sous-unités (SDHD et SDHC) du complexe II de la chaîne respiratoire mitochondriale ont été identifiés comme responsables du paragangliome héréditaire ont été identifiés. Nous avons identifié chez une famille française, une nouvelle mutation non-sens du gène *SDHD*, la perte de l'allèle maternel normal expliquant que seul l'ADN paternel muté s'exprime au niveau tumoral. L'étude enzymatique réalisée sur le phéochromocytome par P. Rustin (A. Roetig, A. Munnich, INSERM U393) a révélé un effondrement complet de l'activité du complexe II comparée à l'activité normale du complexe II analysée chez 8 phéochromocytomes contrôles non porteurs de la mutation. Par hybridation *in situ* et immunohistochimie, J. Favier (Équipe 2) a montré que les voies de réponses à l'hypoxie étaient activées sur les tumeurs de ces patients corroborant l'hypothèse d'un dysfonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale.

Le projet, soutenu par un contrat OBJECTIF INSERM, a pour but essentiel de déterminer l'incidence des mutations somatiques et constitutionnelles des

gènes *SDHD* et *SDHC* dans les phéochromocytomes sporadiques et leur rôle éventuel dans le caractère malin des tumeurs. Cette recherche sera complétée par la recherche d'une perte d'hétérozygotie au niveau tumoral lorsqu'une mutation sera identifiée, à l'aide de marqueurs microsattellites de la région 11q22-23 et 1q21-23. Ceci devrait nous permettre d'établir des corrélations génotype-phénotype (localisation ectopique ou surrenalienne, phéochromocytome bénin ou malin, ...) prenant en compte le type et le site de mutation, et l'importance de la perte d'allèle associée. La disponibilité au sein de la tumorothèque et DNAtèque COMETE (Programme Hospitalier de Recherche Clinique Clinique AOM 95201) dédiée à « l'étude du pronostic et du traitement des tumeurs endocrines de la surrenale » (avis favorable du CCPPRB de Paris-Cochin le 2 juillet 1996), dirigée par le Pr P.F. Plouin, d'ADN leucocytaire et de tissu tumoral de 200 patients opérés d'un phéochromocytome, nous permet d'envisager une étude à grande échelle de ces nouveaux gènes dans le déterminisme du phéochromocytome. À ce titre, nous avons récemment démontré le rôle pronostique (sévérité, localisation, récurrence, malignité) de mutations du gène *SDHB*.

De même, la base de données COMETE possède des informations cliniques et biologiques, une DNAtèque pour plus de 200 sujets avec hyperaldostéronisme primaire non tumoral et plus de 150 sujets avec adénomes de Conn (avec tumorothèque). Dans le cadre de l'ensemble des projets développés par le réseau COMETE, notre rôle sera de rechercher des familles avec hyperaldostéronisme et de tester des polymorphismes génétiques qui pourraient favoriser soit l'hyper-expression d'aldostérone, soit la tumorigénèse elle-même.

*IV-3.2. Sténoses de l'artère rénale (Pr P.F. Plouin, Dr A.P. Gimenez-Roqueplo, Dr B. Fiquet-Kempf)*

Le service d'HTA est impliqué dans plusieurs projets concernant les sténoses de l'artère rénale et/ou la maladie vasculaire athéromateuse. L'essai STAR, Promoteur INSERM (RBM 00-040), compare le traitement médical seul et le traitement médical avec dilatation + stent chez les personnes ayant une sténose athéroscléreuse de l'artère rénale modérée. L'essai est coopératif international (Pays-Bas, France, Angleterre), le promoteur principal étant l'Université d'Utrecht. Les promoteurs associés sont Cordis (fourniture des stents) et, pour la France, le service d'HTA et le CIC de l'HEGP. Dans l'étude AMETHYST (Aneurysm, METalloproteinases, Hypertension Study), Promoteur INSERM RBM 01-32 et 01-37, nous allons comparer dans l'hypertension et la maladie anévrysmale les taux circulants des MMPs et des TIMPs à ceux de témoins appariés par l'âge ; rechercher des corrélations entre ces taux plasmatiques d'une part et les phénotypes intermédiaires morphologiques usuels (épaisseur intima-média, volume anévrysmal) et les facteurs de risque vasculaires d'autre part ; enfin rechercher une relation entre l'évolution de ces phénotypes biologiques et celui des phénotypes morphologiques au cours d'une suivi de 3 ans.

Pour la dysplasie fibromusculaire (DFM), artériopathie systémique d'origine inconnue, touchant les artères musculaires de moyen calibre en particulier les atteintes rénales et cérébrales, nous avons effectué depuis 1995-96 un effort systématique d'évaluation familiale de la DFM à partir de plus de 150 patients atteints de DFM et avons identifié environ 10 % de cas familiaux. Nous poursuivons l'analyse phénotypique de l'atteinte vasculaire — des résultats prometteurs ont été obtenus par échographie de haute résolution en collaboration avec l'unité 337 (S. Laurent, Projet financé par la Sté Française d'Hypertension Artérielle, promotion INSERM).

Nous avons également caractérisé une grande famille de la région Bourgogne souffrant d'une pathologie vasculaire aortique disséquante et d'un nombre anormalement important de persistance du canal artériel (Dr P. Khau Van Kien, service de Génétique de l'Hôpital de Dijon, PHRC régional 2001).

## **V — ANGIOGENÈSE EMBRYONNAIRE ET PHYSIOPATHOLOGIQUE**

Équipe : A. EICHMANN, L. PARDANAUD, L. YUAN, Q. JIANG, F. LE NOBLE,  
D. MOYON, B. PAVIN DE LAFARGE, C. BRÉANT

### **V-1. Relation système vasculaire-système nerveux**

Il existe de nombreuses parallèles anatomiques entre les deux systèmes nerveux et vasculaire. Les deux systèmes se ramifient partout dans l'organisme. Il existe une directionalité de l'information transmise, le flux sanguin artériel et veineux dans un cas, les voies motrices et sensorielles dans l'autre. Les deux systèmes sont composés de deux types cellulaires intimement associés : les CE avec les cellules du mur vasculaire et les neurones avec les cellules gliales.

Il est donc intéressant de constater que plusieurs molécules récemment impliquées dans la différenciation des cellules endothéliales (CE) en artères, veines et vaisseaux lymphatiques ont été initialement découvertes dans le système nerveux, où elles jouent des rôles fondamentaux dans le guidage de neurones et de leurs cônes de croissance (Raper, 2000, *Curr Opin Neurobiol* 10, 88-94).

Nous avons étudié deux de ces récepteurs de guidage axonal, appelés neuropilines 1 et -2 (NRP-1, NRP-2). Ces récepteurs lient aussi les facteurs de croissance de la famille des vascular endothelial growth factor (VEGF), facteurs cruciaux pour l'angiogenèse physiologique et pathologique. L'étude de l'expression des NRP-1 et -2 par hybridation *in situ* et immunomarquages chez l'embryon de souris a montré une expression sélective de la NRP-1 dans l'endothélium des artères et de la NRP-2 dans l'endothélium des veines. L'expression de la NRP-2 se restreint aux vaisseaux lymphatiques après la formation de ces vaisseaux par bourgeonnement à partir des veines. Le rôle de la NRP-2 au cours du développement des CE veineuses et lymphatiques a été étudié chez des souris dont le gène de la NRP-2 a été délété. À l'état homozygote, ces souris montrent des défauts

sélectifs du développement des vaisseaux lymphatiques, leurs veines et artères se forment normalement (Yuan *et al.*, 2002, *Development* 129, 4797-4806.). On constate une baisse du taux de prolifération ainsi qu'un positionnement anormal des vaisseaux lymphatiques chez le mutant, suggérant que le récepteur NRP-2 est impliqué dans leur prolifération et dans leur guidage. Ce récepteur est capable de lier le facteur de croissance Lympo-angiogénique VEGF-C (Karkkainen *et al.*, 2001, *PNAS* 98, 12677-12682), suggérant une interaction entre le VEGF-C et le récepteur NRP-2 afin de médier la lymphangiogenèse. Des études biochimiques et de croisement des souris mutées pour la NRP-2 et le VEGF-C sont actuellement en cours, en collaboration avec le laboratoire de K. Alitalo (Helsinki, Finlande). L'analyse de l'expression des deux récepteurs NRP au cours de pathologies vasculaires chez l'homme adulte est également en cours.

## V-2. Étude des précurseurs endothéliaux embryonnaires circulants

Des études récentes montrent que des précurseurs endothéliaux sont présents dans le sang adulte. *In vitro* ces cellules se différencient en CE, *in vivo* ces précurseurs peuvent être incorporés dans des sites de néovascularisation. Sur le plan thérapeutique, ces cellules circulantes pourraient être utilisées pour acheminer des molécules anti- ou pro-angiogéniques à des sites d'angiogenèse pathologique ou physiologique.

Qu'en est-il chez l'embryon ? En utilisant le système caille-poulet, nous avons vérifié que des angioblastes ou des CE conservent leurs capacités de différenciation et de colonisation lorsqu'ils sont injectés dans la circulation. Dans une deuxième approche, nous avons réalisé des parabioses caille-poulet et montré, en utilisant un marqueur spécifique des CE de caille, que ces cellules circulent et sont retrouvées dans de nombreux territoires embryonnaires mais toujours en faible nombre. Cependant, ces cellules sont mobilisables lors d'une angiogenèse expérimentale, la greffe d'un bourgeon de membre ou une blessure, par exemple, et participent alors en grand nombre au processus de néovascularisation requis. Nous sommes en train d'étudier le stade à partir duquel ces précurseurs circulants émergent dans la circulation ainsi que leur origine embryologique.

### LISTE DE PUBLICATIONS DU LABORATOIRE 2002-2003

2002

COLE J., OUACH DU L., SUNDARAM K., CORVOL P., CAPPECCHI M.R. and BERNSTEIN K.E. Mice lacking endothelial angiotensin-converting enzyme have a normal blood pressure. *Circ. Res.* 90 : 87-92, 2002.

CELERIER J., CRUZ A., LAMANDE N., GASC J.M. and CORVOL P. Angiotensinogen and its cleaved derivatives inhibit angiogenesis. *Hypertension* 39 : 224-228, 2002.

GRANT F.D., ROMERO J.R., JEUNEMAITRE X., HUNT S.C., HOPKINS P.N., HOLLENBERG N.H. and WILLIAMS G.H. Low renin hypertension, altered sodium homeostasis, and an alpha adducin polymorphism. *Hypertension* 39 : 191-196, 2002.

YUAN L., MOYON D., PARDANAUD L., BREANT C., KARKKAINEN M.J., ALITALO K. and EICHMANN A. Abnormal lymphatic vessel development in neuropilin-2 mutant mice. *Development* 129, 4797-4806, 2002.

EICHMANN A., PARDANAUD L., YUAN L. and MOYON, D. Vasculogenesis and the search for the hemangioblast. *J. Hematother. Stem Cell Res.* 11, 207-214, 2002.

BOLDOGKOI Z., REICHART A., TOTH I.E., SIK A., ERDELYI F., MEDVECZKY I., LLORENS-CORTES C., PALKOVITS M. and LENKEI Z. Construction of recombinant pseudorabies viruses optimized for labeling and neurochemical characterization of neural circuitry. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 30 : 109 (1-2) : 105-118, 2002.

REAUX A., GALLATZ K., PALKOVITS M. and LLORENS-CORTES C. Distribution of apelin-synthesizing neurons in the adult rat brain. *Neuroscience* 113 : 653-662, 2002.

ROZENFELD R., ITURRIOZ X., MAIGRET B. and LLORENS-CORTES C. Contribution of molecular modeling and site-directed mutagenesis to the identification of two structural residues, Arg-220 and Asp-227, in aminopeptidase A. *J. Biol. Chem.* 277 : 29242-29252, 2002.

HUS-CITHAREL A., MARCHETTI J., CORVOL P. and LLORENS-CORTES C. Potentiation of  $[Ca^{2+}]_i$  response to angiotensin III by cAMP in cortical thick ascending limb. *Kidney Int.* 61 : 1996-2005, 2002.

SLIM R., TORREMOCHA F., MOREAU T., PIZARD A., HUNT S.C., GUYENE T.T., VUAGNAT A., WILLIAMS G.H., GAUTHIER F., JEUNEMAITRE X. and ALHENC-GELAS F. A loss of function polymorphism at the human tissue kallikrein gene. *J. Am. Soc. Nephrol.* 4 : 968-976, 2002.

FISHER N.D.L., HURWITZ S., JEUNEMAITRE X., HOPKINS P.N., HOLLENBERG N.K., and WILLIAMS G.H. Familial Aggregation of Low-Renin Hypertension. *Hypertension* 39 : 914-918, 2002.

HOPKINS P.N., HUNT S.C., JEUNEMAITRE X., SMITH B., SOLORIO D., FISHER N.D.L., HOLLENBERG N.K. and WILLIAMS G.H. Angiotensinogen genotype affects renal and adrenal responses to angiotensin II in essential hypertension. *Circulation* 105 : 1921-1927, 2002.

SRIKUMAR N., BROWN N.J., HOPKINS P.N., JEUNEMAITRE X., HUNT S.C., VAUGHAN D.E. and WILLIAMS G.H. PAI-1 in human hypertension : relation to hypertensive groups. *Am. J. Hypertens.* 15 : 683-690, 2002.

VARGAS-POUSSOU R., HUANG C., HULIN P., HOULLIER P., JEUNEMAITRE X., PAILLARD M., PLANELLES G., DECHAUX M., MILLER R.T. and ANTIGNAC C. Functional characterization of a calcium-sensing receptor mutation in severe autosomal dominant hypocalcemia with a bartter-like syndrome. *J. Am. Soc. Nephrol.* 13 : 2259-2266, 2002.

FISHER N.D., HURWITZ S., JEUNEMAITRE X., HOPKINS P.N., HOLLENBERG N.K. and WILLIAMS G.H. PAI-1 in human hypertension : relation to hypertensive groups. *Am. J. Hypertens.* 15 : 683-690, 2002.

GIMENEZ-ROQUEPLO A.P., FAVIER J., RUSTIN P., RIEUBLAND C., KERLAN V., PLOUIN P.F., RÖTIG A. and JEUNEMAITRE X. Functional consequences of a SDHB gene mutation in an apparently sporadic pheochromocytoma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87 : 4771-4774, 2002.

FUCHS S., PHILIPPE J., GERMAIN S., MATHIEU F., JEUNEMAITRE X., CORVOL P. and PINET F. Functionality of two new polymorphisms in the human renin gene enhancer region. *J. Hypertens.* 20 : 2391-2398, 2002.

SONNA L.A., GLUECK S.B. and JEUNEMAITRE X. Exercise, genetics and blood pressure : Focus on « Physical exercise and blood pressure with reference to the angiotensinogen M235T polymorphism » and on « angiotensinogen M235T polymorphism associates with exercise hemodynamics in postmenopausal women ». *Physiol. Genomics* 10 : 45-47, 2002.

#### *Revue ou articles dans Livres*

GODIN I. and PARDANAUD L. Généalogie du système sanguin : quelle place pour l'hémangioblaste ? *Hématologie* 8, 231-240, 2002.

DIETERLEN-LIEVRE F., PARDANAUD L., BOLLEROT K. and JAFFREDO T. Hemangioblasts and hemopoietic stem cells during ontogeny. *CR Soc. Biol.* 325, 1013-1020, 2002.

LLORENS-CORTES C. and MENDELSON F.A. Organisation and functional role of the brain angiotensin system. *J. Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 3 (Suppl 1) : S39-S48, 2002.

JEUNEMAITRE X., DISSE-NICODEME S., GIMENEZ-ROQUEPLO A.P. and CORVOL P. Human essential hypertension : role of the renin aldosterone system. In *Textbook of Cardiovascular Medicine*, 2<sup>nd</sup> Edition, Topol Eric J. Editor, Lippincott-Williams and Wilkins Publishers, Cleveland, 2002, chapter 99 (electronic edition).

JEUNEMAITRE X., BOUTOUYRIE P., GIMENEZ-ROQUEPLO A.P., LACOLLEY P., GERMAIN D.P. and LAURENT S. Génétique des maladies vasculaires : stratégies d'investigation. in *Biologie et Pathologie du cœur et des vaisseaux*, édité par le Groupe de Réflexion sur la Recherche Cardiovasculaire (GRCC), Pinet F., Babuty D., Carrier L., Duperray A., Grynberg A., Loirand G., Samuel J.L. (coordonnateurs), Médecine-Sciences Flammarion, 2002, pp. 471-482.

JEUNEMAITRE X. and GIMENEZ-ROQUEPLO A.P. Génétique et Hypertension artérielle : trois approches pour décrypter une maladie complexe. *Bull. Acad. National Med.*, 2002, N° 7.

2003

JILANI S.M., MURPHY T.J., THAI S.N., EICHMANN A., ALVA J.A. and IRUELA-ARISPE M.L. Selective binding of lectins to embryonic chicken vasculature. *J. Histochem Cytochem.* 51, 597-604, 2003.

MULLER L., BARRET A., ETIENNE E., MEIDAN R., VALDENNAIRE O., CORVOL P. and TOUGARD C. Heterodimerization of endothelin converting enzyme-1 isoforms regulates the subcellular distribution of this metalloprotease. *J. Biol. Chem.* 278 : 545-555, 2003.

LE JAN S., AMY C., CAZES A., MONNOT C., LAMANDE N., FAVIER J., PHILIPPE J., SIBONY M., GASC J.M., CORVOL P. and GERMAIN S. Angiopoietin-Like 4 Is a Proangiogenic Factor Produced during Ischemia and in Conventional Renal Cell Carcinoma. *Am. J. Pathol.* 162 : 1521-1528, 2003.

HOUARD X., MONNOT C., DIVE V., CORVOL P. and PAGANO M. Vascular smooth muscle cells efficiently activate a new proteinase cascade involving plasminogen and fibronectin. *J. Cell. Biochem.* 88 : 1188-1201, 2003.

DUGOURD C., GERVAIS M., CORVOL P. and MONNOT C. Akt is a major downstream target of PI3-kinase involved in angiotensin II-induced proliferation. *Hypertension* 41 : 882-890, 2003.

WRIGHT J.W., TAMURA-MYERS E., WILSON W.L., ROQUES B.P., LLORENS-CORTES C., SPETH R.C. and HARDING J.W. Conversion of brain angiotensin II to angiotensin III is critical for pressor response in rats. *Am. J. Physiol.* 284 : R725-733, 2003.

ACHARD J.M., WARNOCK D.G., DISSE-NICODEME S., FIQUET-KEMPF B., CORVOL P., FOURNIER A. and JEUNEMAITRE X. Familial hyperkalemic hypertension : phenotypic analysis in a large family with the WNK1 deletion mutation. *Am. J. Med.* 114 : 495-498, 2003.

IVES N.J., WHEATLEY K., STOWE R.L., KRIJNEN P., PLOUIN P.F., VAN JAARSVELD B.C. and GRAY R. Continuing uncertainty about the value of percutaneous revascularization in atherosclerotic renovascular disease : a meta-analysis of randomized trials. *Nephrol. Dial Transplant.* 18 : 298-304, 2003.

MERIA P., KEMPF B.F., HERMIEU J.F., PLOUIN P.F. and DUCLOS J.M. Laparoscopic management of primary hyperaldosteronism : Clinical experience with 212 cases. *J. urol.* 169 : 32-35, 2003.

#### *Revues et articles dans Livre*

STEFAN-MARTIN HERRMANN S.M. and JEUNEMAITRE X. Stratégies Génétiques communes de la maladie coronaire et de la maladie hypertensive in « Athérosclérose, physiopathologie, diagnostics et thérapeutiques » Toussaint J.F., Jacob M.P., Lagrost L., Chapman J., Éd. Masson, Paris, mai 2003.

## EXPOSÉS, CONGRÈS, ENSEIGNEMENTS

**Monsieur le Pr Xavier Junemaitre** a participé aux enseignements suivants : Responsable de l'enseignement de Génétique à l'Université Paris VI (PCEM1, DCEM1). Responsable au sein de l'UFR Broussais-Hotel Dieu du Certificat de Maîtrise SBM de Paris VI « Génétique Humaine et Comparée », Membre du Comité du DEA et participation au DEA de Génétique Humaine de Paris 6-Paris 7. Participations au Certificat C2 de Biologie Moléculaire (Paris V, Pr Delpech), à la Maîtrise des Sciences Biologiques et Médicales Physiologie et Biologie des Systèmes Intégrés (Paris 6, Pr Paillard), au DEA de Pharmacologie Cardiovasculaire organisé par les Pr Safar et Sassard, au Diplôme Universitaire de Néphrologie Pédiatrique (UFR Necker-Enfants Malades, Pr Broyer), au DES d'Endocrinologie de Paris 6 (Pr Paillard), au DEA de Génétique Humaine de la Maîtrise d'Orsay (Pr Feuteun). Organisation et participation aux 2<sup>es</sup> Journées de Formation Formation Continue de l'AP-HP, sur le thème « Actualités sur la Génétique », les 25-26 février 2003, Centre de Formation de l'AP/HP, Paris.

**Monsieur le Pr Xavier Junemaitre** a participé aux congrès et séminaires suivants : Co-organisation avec le Pr P. Corvol, de la journée intitulée « Génétique des Pathologies Cardiovasculaires », Collège de France, Paris, février 2002 ; *Summer Gordon Conference on Angiotensin*, Italy, 6-10 May 2002 ; International Society of Hypertension, ISH/ESH Meeting, Prague, June 2002 ; Co-organisation de l'European Council for blood pressure and Cardiovascular Research (ECCR), Noordwikerhout, The Netherlands, 11-13 octobre 2002 ; XXII<sup>e</sup> Journées de l'Hypertension Artérielle, 12-13 décembre 2002.

**Conférences invitées 2002** : « Genetics of arterial hypertension », Meeting on Genetics of Cardiovascular and Metabolic Diseases, Lausanne, 7-8 février 2002 ; « Génétique des Hypertensions hyperkaliémiques familiales », Genetics of Cardiovascular diseases, Collège de France Paris, 26 mars 2002 ; « New genes involved in arterial hypertension » *Summer Gordon Conference on Angiotensin*, Italy, 6-10 May 2002 ; « Intermediate phenotypes in human essential hypertension », Workshop First ISH/ESH Meeting, Prague, June 2002 ; Monogenic forms of human hypertension, European Society Hypertension, Summer School, Glasgow, Sept. 16-19, 2002 ; « Stratégies génétiques d'étude de l'hypertension artérielle », Réunion Interface INSERM/ Société Québécoise de Recherche, Paris ; « Dyskaliémie : élément essentiel de découverte des hypertensions artérielles génétiquement déterminées », Lecture plénière, Société Française d'Endocrinologie, Tours, France, Oct. 3, 2002 ; « Genetics of Endocrine Hypertension », Lecture plénière, 12th Meeting of the Belgian Endocrine and Metabolic Societies, Bruxelles, Belgique, Nov 30, 2002.

**Monsieur le Pr Xavier Junemaitre** a été expert dans les instances suivantes : Membre de la Commission Scientifique Spécialisée n° 6 de l'INSERM (système cardiovasculaire, respiratoire et musculaire) 1999-2003 ; Membre de la Commission AVENIR de l'INSERM 2001-2005 ; Membre du Comité de Pilotage sur les

Centres de Ressources Biologiques (CRB) INSERM 2002 ; Membre du Conseil Scientifique de la Faculté Broussais-Hotel Dieu 2000 ; Membre du Conseil de Gestion de la Faculté Broussais-Hotel Dieu 2002 ; Membre de la Commission consultative nationale en matière d'examens des caractéristiques génétiques à des fins médicales (Ministère de la Santé) 2001.

**Mme Catherine Monnot** a participé aux congrès et séminaires suivants : XXVIIth european symposium on hormones and cell regulation. Mont Sainte-Odile, 20-23 septembre 2002 ; Cell signaling, transcription and translation as therapeutic targets. Luxembourg, 30 janvier-2 février 2002.

**Mme Catherine Monnot a participé** à l'enseignement suivant : 28 mars 2003. Formation permanente du centre scientifique d'Orsay (Université Paris-Sud XI) : Pharmacologie et toxicologie moléculaires (module 1). Bases moléculaires de la pharmacologie.

**Monsieur Laurent Muller** a participé aux congrès suivants : International congress of neuroendocrinology, Bristol, septembre 2002 ; Les applications de la protéomiques, Congrès de la société française d'électrophorèse et d'analyse protéomique, Lille, octobre 2002 ; 42<sup>e</sup> Congrès de l'American Society for Cell Biology, San Francisco, décembre 2002 ; Imaging the Cell, Congrès de la Société française de Biologie cellulaire, Paris, avril 2003.

**Monsieur Laurent Muller** a participé aux enseignements suivants : Maîtrise de sciences biologiques et médicales. Certificat de biologie moléculaire de la cellule, Université Paris XI, UFR médicale de Bicêtre ; DEA d'endocrinologie et d'interactions cellulaires, Université Paris XI, UFR médicale de Bicêtre.

**Monsieur Jean-Marie Gasc** a participé au congrès suivant : GORDON Conference on Angiotensin (Il Ciocco, Italie) 5 à 10 Mai 2002. « Angiotensin Converting Enzyme : early expression in embryonic development ».

**Madame Catherine Llorens-Cortes et son équipe** ont participé aux congrès et séminaires suivants : Llorens-Cortes C. : Angiotensin III : a central regulator of vasopressin release and blood pressure. 46<sup>th</sup> Annual Meeting of the Western Pharmacology Society, Lake Tahoe, Nevada (USA), 2-6 février 2003. Llorens-Cortes C. : Utilisation de l'internalisation pour rechercher le ligand endogène d'un GPCR orphelin : application au récepteur de l'apéline. Atelier d'Imagerie Cellulaire en Neurosciences, Rouen (France), 13 mai 2003. Llorens-Cortes C., Corvol P., Fassot C., Fournie-Zaluski M.C., Iturrioz X., Roques B.P., Reaux A., Rozenfeld R., Valentin B. : CNS neuropeptidases and hypertension. Symposium, FENS, Paris (France), juillet 2002. El Messari S., FENS, Paris (France), juillet 2002. Hus-Citharel A., Marchetti J., Iturrioz X., Corvol P., Llorens-Cortes C. : Cross-interactions between angiotensin II and bradykinin in the Rat Cortical Thick Ascending Limb (CTAL) ASN 35<sup>th</sup> Annual Meeting and Scientific Exposition, Philadelphia, Pennsylvania (USA), 30 oct., 4 nov. 2002. Reaux A. : Neuroscience, nov. 2002.

**Madame Catherine Llorens-Cortes a donné les séminaires suivants :**  
 11 avril 2003 — Invitée par le Dr Kenneth Takeda (UMR CNRS 7034, Pharmacologie et Physicochimie des Interactions Cellulaires et Moléculaires, Université Louis Pasteur, Illkirch, France). L'apéline, un nouveau neuropeptide : de la découverte du ligand au rôle physiologique. 13 mars 2003 — Invitée par le Pr Casanueva (Molecular Endocrinology Laboratory, University of Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Espagne). Orphan GPCRs : from the ligand discovery to the physiological role. Application to apelin.

**Madame Catherine Llorens-Cortes a participé aux enseignements suivants :**  
 3<sup>e</sup> cycle C2 de Maîtrise et Diplôme d'Université « Pharmacologie Endocrinienne », Paris VII ; Cours SANOFI-SYNTHELABO, Réceptologie, niveau 2, 19-21 mars 2003.

**Madame Anne Eichmann et son équipe** ont participé aux congrès et séminaires suivants : **Anne Eichmann** : Conférencier invité : International symposium on angiogenesis and microcirculation, June 2002, Ascona, Suisse : Abnormal lymphatic vessel development in neuropilin-2 mutant mice. Conférencier invité : ESH Conference on Angiogenesis, octobre 2002, Cascais, Portugal : Neuropilin receptors in vascular development. Conférencier invité : Conférence du ministère des Sciences Autrichien, Stem Cells and therapeutic applications, novembre 2002, Vienne, Autriche : Embryonic hemangioblasts. **Luc Pardanaud** : 10 décembre 2002 : Invitation de Y. Takahashi au « Nara Institute of Science and Technology », Nara, Japon : Cellular and molecular aspects of the vascular system in the avian model. 11-14 décembre 2002 : Invitation au « 25th Annual meeting of the Molecular Biology Society of Japan », Yokohama, Japon : The quail -chick chimera model and the rediscovery of the experimental embryology. Congrès organisé : Mini-symposium sur le remodelage du sac vitellin, 16 décembre 2002.

Orateurs invités : Ralph Adams, London research Institute, Grande-Bretagne. Valentin Djonov, Université Bern, Suisse. Ferdinand Le Noble, Université Maastricht, Pays-Bas. Vincent Fleury, École Polytechnique, Orsay

#### LISTE DES DIPLÔMÉS

##### DEA

**Gabin Sihh** : DEA (Endocrinologie et signalisations intra-cellulaires, Université Paris XI)

Soutenance le

*L'aminopeptidase N au cours du développement embryonnaire : ontogenèse et rôle possible dans l'angiogenèse.*