

## Médecine expérimentale

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

### MODELAGE ET REMODELAGE VASCULAIRE

Le cours de la Chaire de Médecine Expérimentale a porté sur trois mécanismes contribuant à l'élaboration de l'architecture vasculaire et qui ont été élucidés récemment. Chacun d'entre eux a comme intérêt d'être impliqué en physiopathologie et de représenter une nouvelle cible thérapeutique potentielle dans le contrôle de l'angiogenèse.

#### Progéniteurs circulants des cellules endothéliales. L'hémangioblaste

La première étape du développement vasculaire chez l'embryon est la différenciation d'un précurseur mésodermique en hémangioblaste. L'hémangioblaste a une double polarité, celle de donner naissance à des cellules souches hématopoïétiques et à l'angioblaste, précurseur des cellules endothéliales impliquées dans la formation du plexus capillaire primitif (étape de vasculogenèse). La réalité de l'hémangioblaste a été longtemps débattue mais semble bien établie actuellement du fait de l'existence de plusieurs types de relations entre l'angiogenèse et l'hématopoïèse au cours de l'embryogenèse : relation spatiale (présence de cellules souches hématopoïétiques dans la région ventrale de l'aorte dorsale et intégration de ces cellules dans la paroi vasculaire), relation temporelle (coïncidence du développement des amas cellulaires para-aortiques et de la colonisation des organes hématopoïétiques) et relation génétique (présence d'un précurseur commun hémangioblastique dans les corps embryonnaires et expression spécifique de gènes à la fois dans les cellules endothéliales et les cellules souches hématopoïétiques). L'hypothèse d'un « endothélium homogénique » émise par Jordan en 1916 se trouve donc actuellement confirmée par des études *in vitro* (différenciation en culture cellulaire de cellules embryonnaires de poulet exprimant le récepteur-2 du VEGF (VEGF-R2+) en cellules endothéliales sous l'effet

du VEGF ou en cellules hématopoïétiques en l'absence de VEGF et en présence d'autres facteurs) et *in vivo* : absence à la fois d'hématopoïèse et d'angiogenèse dans les cultures d'explants de splanchno-pleure chez les souris dépourvues du gène AML-1. Dans ce dernier modèle, la formation de capillaires dans le péri-cardie et le cerveau dépend de la production d'angiopoïétine-1 (ANG-1) par les cellules souches hématopoïétiques.

La présence de cellules endothéliales circulantes lors de lésions vasculaires a été documentée dans des affections telles que la drépanocytose, la phase aiguë de l'infarctus du myocarde, le purpura thrombocytopénique, ... Plusieurs travaux sont en faveur de l'existence de progéniteurs circulants de cellules endothéliales pouvant contribuer à l'angiogenèse. Dans un travail rapporté dans *Science* en 1997, le groupe d'Isner a caractérisé des progéniteurs putatifs des cellules endothéliales. Après isolement de cellules sanguines exprimant l'antigène CD34 et leur mise en culture, les cellules obtenues expriment plusieurs gènes des cellules endothéliales : eNOS, VEGF-R2, CD31. Afin de savoir si ces cellules pouvaient contribuer à l'angiogenèse *in vivo*, des CD34+ cultivées ont été injectées chez l'animal dans le modèle d'ischémie aiguë de la patte chez la souris et le lapin. Ces cellules s'incorporent *in vivo* dans le territoire vasculaire ischémié.

Le fait que les cellules progénitrices des cellules endothéliales puissent contribuer à la formation de l'endothélium vasculaire a été confirmé par d'autres types d'expériences. Afin de savoir si l'endothélialisation d'un greffon aortique provenait de cellules endothéliales circulantes, elles-mêmes originaires de progéniteurs de la moelle sanguine, Shi *et coll.* (*Blood* 92 : 362, 1998) ont posé un greffon aortique en dacron chez des chiens ayant subi une irradiation corporelle subléthale. Après transplantation médullaire, on observe au niveau du greffon l'existence de cellules endothéliales dont l'origine est bien la moelle osseuse du donneur, tel qu'on peut le déterminer par des marqueurs génétiques différenciant le donneur du receveur. De même, l'étude rapportée par Gonsilius *et coll.* (*Lancet* 355 : 16-88, 2000) de six patients atteints de leucémie myéloïde chronique et ayant subi une greffe médullaire a montré la présence de cellules du phénotype HLA du donneur dans l'endothélium vasculaire du receveur. Lin *et coll.* (*J. Clin. Invest.* 105 : 71, 2000) ont isolé des cellules endothéliales circulantes à partir de patients ayant subi une transplantation médullaire d'un sujet de sexe différent. Ces cellules provenaient du donneur et exprimaient le phénotype d'une cellule endothéliale (facteur Von Willebrand, intégrine  $\alpha_v$ , VE-cadherine, internalisation de l'acétyl-LDL). Leurs résultats montrent, par ailleurs, qu'en culture cellulaire, les cellules endothéliales en croissance rapide proviennent de cellules issues de la moelle osseuse, et représentent vraisemblablement des angioblastes circulants chez l'adulte, à l'instar des angioblastes présents lors du développement embryonnaire.

Plusieurs travaux ont montré que la transplantation de progéniteurs de cellules endothéliales pouvait contribuer à une néoangiogenèse aboutissant à une augmentation du flux sanguin dans des modèles d'ischémie aiguë chez le rongeur : Kalka

*et coll.* (PNAS 97 : 34-22, 2000) ont montré une augmentation du flux artériel par doppler dans la patte ischémique de souris chez qui sont injectées des cellules endothéliales. Des résultats similaires ont été obtenus à partir de progéniteurs de cellules endothéliales issus du cordon ombilical humain. Les cellules endothéliales ainsi récoltées sont plus nombreuses et possèdent les mêmes caractéristiques que celles issues du sang systémique. Il est enfin possible de stimuler une néovascularisation fonctionnelle en mobilisant les précurseurs des cellules endothéliales par l'administration de facteurs de croissance tels que le GM-CSF (Takahashi *et coll.*, Nature Med. 5 : 434, 1999).

En conclusion, il existe très vraisemblablement des hémangioblastes circulants chez l'adulte, originaires de la moelle osseuse. Il est possible de pratiquer une expansion *ex vivo* de ces progéniteurs en culture et d'obtenir des cellules possédant le phénotype complet de cellules endothéliales. Les progéniteurs de cellules endothéliales peuvent s'intégrer dans l'endothélium vasculaire aux sites de néoangiogenèse notamment en cas d'ischémie et participer ainsi au renouvellement de l'endothélium. Une vasculogenèse serait donc présente chez l'adulte, ce qui ouvre des possibilités thérapeutiques intéressantes de transplantation de cellules endothéliales. En effet, la thérapie angiogénique par des facteurs de croissance tels que le VEGF, le FGF, le HGF, le PlGF est limitée par le développement de capillaires et d'artérioles de petit calibre (< 200  $\mu$ ), peut être du fait qu'un seul facteur de croissance est délivré pour promouvoir l'angiogenèse. Les progéniteurs des cellules endothéliales auraient comme intérêt de se multiplier rapidement et d'apporter de nombreux facteurs de croissance vasculaire. Toutefois, la transplantation de cellules autologues issues de sujets sains et pathologiques se heurte, au moins en théorie, à plusieurs limites : le faible nombre de progéniteurs des cellules endothéliales présentes dans le sang, la modeste incorporation des cellules souches dans les sites de néoangiogenèse (environ 10 % des cellules endothéliales vasculaires), la possibilité d'incorporation des cellules souches dans d'autres sites que ceux de la néoangiogenèse, la question de la pérennité de l'effet et de la sécurité du procédé. Les progrès proviendront de l'amélioration des techniques d'isolement et de purification en grandes quantités des cellules progénitrices des cellules endothéliales afin d'obtenir des populations aussi pures et aussi riches que possible.

### **Intégrines, l'intégrine $\alpha_v\beta_3$**

Les intégrines sont des molécules insérées dans la membrane plasmique et qui comportent deux domaines, un large domaine, extracellulaire, et un court domaine intracellulaire. Elles interagissent au niveau extracellulaire avec différentes protéines de la matrice extracellulaire et d'autres molécules telles que les métalloprotéases. Au niveau intracellulaire, elles interagissent avec les protéines du cytosquelette. Elles sont capables de transduire un message de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule (outside to in) ou un message cellulaire à l'extérieur de

la cellule (inside to out). Les intégrines sont organisées sous la forme d'hétérodimères consistant en une sous-unité alpha et une sous-unité bêta. Il existe environ 18 sous-unités alpha (poids moléculaire 120-180 KD) et 8 sous-unités bêta (90-110 KD), correspondant à vingt combinaisons possibles d'intégrines. Au niveau intracellulaire, l'activation des intégrines s'accompagne de différents événements de signalisation tels que l'élévation du pH et du calcium intracellulaire, l'augmentation de la production de phosphatidyl-inositol, une déphosphorylation accrue de protéines telles que FAK, Src, Shc, MAP-kinase, .... Il existe une redondance et une dégénérescence des intégrines dans la mesure où plusieurs intégrines peuvent interagir avec la même protéine de la matrice extracellulaire et qu'inversement, une même protéine de la matrice peut se lier à différents types d'intégrines.

L'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  est une intégrine impliquée dans l'angiogenèse et le remodelage vasculaire. Elle est exprimée essentiellement dans les néovaisseaux (angiogenèse embryonnaire, tumorale et inflammatoire) mais peu ou pas dans les vaisseaux quiescents. Elle est aussi présente dans les leucocytes, les macrophages, les ostéoclastes et dans certaines tumeurs malignes. Les ligands extracellulaires de l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  sont des protéines de la matrice extracellulaire : vitronectine, fibronectine, thrombospondine, ostéopontine, facteur Von Willebrand. Ces protéines lient  $\alpha_v\beta_3$  (et les intégrines en général) par une séquence tripeptidique arginine-glycine-aspartyl (RGD). Un autre ligand de l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  est la matrix métalloprotéase 2 (MMP-2) qui participe à la dégradation de la matrice extracellulaire et donc à la néoangiogenèse. Les travaux de Brooks *et coll.* ont montré que MMP-2 interagissait directement avec  $\alpha_v\beta_3$  (Cell 85 : 683, 1996) et que cette interaction faisait intervenir le domaine C-terminal de MMP-2 appelé PEX. L'interaction entre MMP-2 et  $\alpha_v\beta_3$  s'est révélée être indispensable à la progression de l'angiogenèse dans des modèles tels que la membrane chorioallantoïdienne (CAM) de poulet. Des anticorps anti- $\alpha_v\beta_3$  inhibent l'angiogenèse induite par le FGF et le TNF $\alpha$  dans ce modèle. De même, l'angiogenèse due à la greffe de tumeurs sur la CAM est supprimée par ces anticorps. L'angiogenèse de la CAM est inhibée par l'administration d'une molécule PEX recombinante qui supprime l'interaction entre la MMP-2 endogène et  $\alpha_v\beta_3$  (Brooks *et coll.* Cell 92 : 301, 1998). Cette propriété de PEX a été mise à profit pour imaginer de nouvelles stratégies d'inhibition de l'angiogenèse et de la tumorigenèse. Treffer *et coll.* (PNAS 97 : 12227, 2000) ont supprimé l'angiogenèse tumorale par PEX produit grâce à un vecteur lentiviral. Siletti *et coll.* (PNAS 98 : 2001) ont bloqué l'interaction de  $\alpha_v\beta_3$  avec MMP-2 par un composé organique découvert par criblage chimique et ont obtenu des résultats similaires sur le ralentissement de la progression de tumeurs expérimentales.

L'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  se lie par ailleurs à VEGF-R2 via son domaine extracellulaire : Soldi *et coll.* (EMBO J 18 : 882, 1999) ont montré que la liaison  $\beta_3$ -récepteur du VEGF était nécessaire à l'activation du programme angiogénique de VEGF-R2. La phosphorylation de VEGF-R2 et l'activité mitogénique qui en dépend ne

s'observent que lorsque les cellules endothéliales adhèrent à la vitronectine via l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$ . Enfin, Borgesse *et coll.* (JBC 275 : 39867, 2000) ont montré que  $\alpha_v\beta_3$  s'associait au récepteur  $\beta$  du PDGF (PDGF-R $\beta$ ). Il en résulte une augmentation intracellulaire de l'activité tyrosine-kinase de ce récepteur.

Étant donné les interactions diverses de  $\beta_3$  avec des protéines extracellulaires et des récepteurs de facteurs de croissance impliqués dans l'angiogenèse, on aurait pu imaginer que l'inactivation de ce gène entraînerait un phénotype vasculaire. En fait, l'inactivation du gène  $\beta_3$  chez la souris ne provoque aucune anomalie du développement vasculaire mais entraîne un équivalent murin de la thrombasthénie de Glanzman, reproduisant ainsi une anomalie de l'agrégation plaquettaire chez l'homme. En revanche, l'inactivation de l'ensemble des intégrines  $\alpha_v$  s'accompagne dans 80 % des cas d'une léthalité à E10-12 par défaut du développement du placenta tout en permettant une naissance chez 20 % des souris (Bader *et coll.* Cell 95 : 507, 1998). Ces dernières présentent des hémorragies cérébrales et intestinales et meurent dans la période périnatale. Chez ces souris, on observe des dilatations des vaisseaux du système nerveux central (défaut d'adhésion à la matrice extracellulaire, aux cellules gliales), ainsi qu'au niveau cérébral et intestinal.

De l'ensemble de ces travaux,  $\alpha_v\beta_3$  apparaît jouer un rôle essentiel dans la survie et la différenciation des cellules vasculaires en voie d'angiogenèse. Plusieurs implications, diagnostiques et thérapeutiques, peuvent être tirées de ces travaux expérimentaux : sur le plan diagnostique,  $\alpha_v\beta_3$  pourrait être un marqueur diagnostique et(ou) pronostic des tumeurs agressives. Sur le plan thérapeutique, l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  peut être inhibée par différentes stratégies : anticorps anti- $\beta_3$ , PEX recombinant, molécules peptidiques et non-peptidiques supprimant l'interaction d' $\alpha_v\beta_3$  avec soit les protéines de la matrice extracellulaire au niveau de la séquence RGD ou avec la MMP-2. Expérimentalement, le blocage d' $\alpha_v\beta_3$  inhibe l'angiogenèse et la tumorigenèse dans la CAM, inhibe la croissance des vaisseaux rétinien et les xénotreffes de tumeurs humaines chez la souris, ralentit la néoangiogenèse cornéenne et l'arthrite inflammatoire chez le lapin. Cette approche « anti  $\alpha_v\beta_3$  » peut être prometteuse, à l'instar des résultats intéressants obtenus en utilisant des anticorps dirigés contre l'intégrine  $\alpha_{2b}\beta_3$  dans la prévention des phénomènes de thrombose dans l'angioplastie coronaire.

### Effets anti-angiogénique des serpins

L'activité anti-angiogénique de la famille des serpins est une découverte récente. Les inhibiteurs des protéases à sérine (serpins) partagent une structure tertiaire similaire faite de feuilletés bêta antiparallèles et d'une boucle centrale réactive. Certaines serpins sont inhibitrices de protéases par clivage du centre réactif, telles l'antithrombine III, l' $\alpha_1$ -antitrypsine. D'autres n'inhibent pas de protéases (serpins non-inhibitrices), bien qu'elles partagent la même conforma-

tion que les serpins inhibitrices, telles le facteur pigmentaire dérivé de l'épithélium (PEDF), la maspine et l'angiotensinogène.

L'équipe de J. Folkman (O'Reilly *et coll.* Science 285 : 1926, 1999) recherchait un facteur anti-angiogénique à partir de lignées de cancers pulmonaires à petites cellules. En criblant *in vivo* ces lignées, ils ont découvert un facteur qu'ils ont purifié et séquencé et qui s'est avéré être l'antithrombine III. L'antithrombine non clivée n'exerce aucun effet anti-angiogénique tandis que l'antithrombine clivée ou latente est anti-angiogénique dans le modèle de la CAM, ce qui exclut une activité d'inhibition de serpène dans cette activité. Ces deux dernières formes d'antithrombine inhibent la prolifération des cellules endothéliales induite par le VEGF et possèdent un effet antitumoral sur la croissance de neuroblastome humain chez la souris athymique. Ces résultats indiquaient qu'une serpène, comme l'antithrombine III, sous sa forme clivée ou latente, exerçait une fonction anti-angiogénique, indépendamment de son activité antithrombine.

De façon similaire, Dawson *et coll.* (Science 285 : 245, 1999), cherchaient à caractériser des facteurs anti-angiogéniques dans l'œil, en partant de l'hypothèse que le contrôle de l'angiogénèse dans la cornée et le vitrée était lié à la présence d'un (ou de) composé(s) anti-angiogénique(s). En criblant des milieux de culture de lignées de rétinoblastomes, ils ont découvert un facteur anti-angiogénique qui s'est avéré être le PEDF. De fait, le PEDF inhibe la migration et la prolifération des cellules endothéliales, ainsi que la néovascularisation de la cornée de rat. Le PEDF est régulé par la pression partielle d'oxygène : l'expression de PEDF détecté par immunohistochimie dans la rétine augmente chez les souriceaux nouveau-nés exposés à une hyperoxie. Inversement, le PEDF diminue dans les milieux de culture de cellules de rétinoblastome mises en hypoxie. Le PEDF exercerait donc un effet permissif sur l'angiogénèse oculaire en cas d'hypoxie. Le PEDF aurait deux fonctions : une activité neurotrophique portée par son domaine N-terminal et un effet anti-angiogénique se manifestant en normoxie ou hyperoxie, par son domaine serpène C-terminal.

La maspine est un gène suppresseur de tumeur telles que celles du sein et de la prostate. Partant de l'analogie de la maspine, serpène non-inhibitrice, avec le PEDF et l'antithrombine III, Zang *et coll.* (Nat. Med. 6 : 196, 2000) ont étudié son potentiel anti-angiogénique. Comme les deux autres serpins, la maspine exerce un effet anti-angiogénique *in vitro* et *in vivo*. Les mutants de la maspine sur la boucle du centre réactif conservent leur activité anti-angiogénique montrant ici encore que l'activité anti-angiogénique n'est pas lié à cette région caractéristique des serpins. La maspine réduit la tumorigénèse et l'angiogénèse tumorale chez la souris athymique (xénogreffe de cancer prostatique). Dans un autre modèle, la transgénèse additive ciblée de la maspine chez des souris transgéniques promptes à développer des cancers mammaires réduit la croissance tumorale et diminue la densité des microvaisseaux (Zang *et coll.*, Oncogène 19 : 6053, 2000). Son mécanisme d'action pourrait passer par un effet pro-apoptotique des

cellules tumorales ou endothéliales, mécanisme qui pourrait aussi être mis en jeu dans l'activité angiogénique du PEDF et de l'antithrombine III.

P. C.

#### RAPPORT D'ACTIVITÉ DU LABORATOIRE

### I — ÉTUDE DU SYSTÈME RÉNINE-ANGIOTENSINE-ALDOSTÉRONNE ET DE LA MÉTALLOPROTÉASE CRYPTIQUE DE LA FIBRONECTINE

Équipe : P. CORVOL, C. HUBERT, M. PAGANO, A. MICHAUD, X. HOUARD, S. FUCHS, S. SALENAVE, J. PHILIPPE

#### Étude *in vitro* du promoteur de la rénine humaine : Éléments de réponse au calcium

L'expression du gène et la sécrétion de la rénine sont réprimées par une élévation de la concentration intracellulaire du calcium, ce qui constitue une originalité, car l'élévation du calcium intracellulaire s'accompagne le plus souvent d'une stimulation de la transcription des gènes et de la sécrétion des protéines. La rénine est le seul facteur endocrine/paracrine avec la parathormone et le facteur natrial natriurétique (ANF) à être régulée de manière inverse par le calcium intracellulaire. Nous avons recherché les régions régulées par le calcium dans le promoteur humain de la rénine. Nous avons réalisé le séquençage du promoteur humain de la rénine sur 19 000 paires de bases (pb). Cette séquence nous a permis de mettre en évidence *in silico* la présence de plusieurs séquences putatives nCaRE (Negative Calcium Response Element). Ces régions sont impliquées dans la répression de la transcription du gène de la parathormone en réponse à l'élévation du calcium intracellulaire par liaison du facteur de transcription Ref-1. Par Northern Blot, le facteur Ref-1 s'avère être présent dans différents modèles de cellules productrices de rénine. L'équipe a aussi montré en transfection transitoire dans les cellules chorioniques (modèle de cellules humaines productrices de rénine) que la séquence nCaRE située à -1781 pb en amont du site d'initiation dans la région promotrice de la rénine, était fonctionnelle. Elle est responsable de la répression de la transcription lors d'une élévation du calcium intracellulaire. Des expériences de retardement sur gel ont montré une interaction ADN/protéine entre la séquence nCaRE et les extraits nucléaires de cellules chorioniques. L'utilisation d'un anticorps anti-Ref-1 a entraîné un supershift de cette interaction. **Ces résultats suggèrent que, en réponse à une élévation intracellulaire du calcium, le facteur Ref-1 se lie à la séquence nCaRE.** Il en résulte une répression de la transcription du promoteur de la rénine.

La rénine est exprimée quasi-exclusivement dans les cellules juxtaglomérulaires du rein, et à un moindre niveau dans le chorion. Dans le laboratoire, un activateur très puissant et spécifique de la transcription du gène de la rénine

dans les cellules chorioniques à été mis en évidence entre – 5552 et – 5772 pb en amont du site d'initiation de la transcription (Germain *et al.* 1998).

Nous avons émis l'hypothèse que des variants de cet activateur pourraient être associés à une pathologie hypertensive gravidique du fait de la production de rénine dans le chorion. Une étude a été effectuée à partir de l'ADN génomique d'une population de femmes ayant présenté un épisode d'éclampsie ou de prééclampsie au cours d'une grossesse. Par amplification par PCR de la région activatrice, ont été mis en évidence deux variants à – 5434 et – 5312 où le nucléotide est soit un T soit un C. Afin de tester la fonctionnalité de ces variants sur l'expression du gène de la rénine, les quatre séquences de promoteur rencontrées dans la population ont été sous-clonées, en amont du promoteur proximal de la rénine (892 pb) et de la luciférase. Elles ont été étudiées en transfection transitoire dans les cellules chorioniques. Ces expériences suggèrent que : **1)** la région activatrice est plus étendue que celle précédemment décrite, **2)** son activation sur le promoteur basal de 892pb atteint 200 fois si il y a une thymidine en position – 5312, **3)** les variants en position – 5434 sont sans effet sur la transcription *in vitro*.

## **2. Étude *in vivo* du promoteur de la rénine humaine chez la souris transgénique**

Les études menées *ex vivo* en culture cellulaire avaient montré qu'un fragment du promoteur humain de la rénine de 892 bp était suffisant pour obtenir une expression spécifique dans les cellules productrices de rénine. Nous avons voulu savoir si, *in vivo*, chez la souris transgénique, ce promoteur permettait une spécificité tissulaire et cellulaire de l'expression.

Nous avons amélioré nos constructions de transgénèse en utilisant, d'une part, un gène Lac-Z dont l'expression de la  $\beta$ -galactosidase est localisée dans les noyaux, grâce à une séquence de localisation nucléaire (NLS), et d'autre part, des « matrix attachment regions » (MAR), qui permettent d'insulariser le transgène des régions régulatrices proches de son site d'insertion dans le génome de la souris. Nous avons donc ainsi étudié quatre transgènes utilisant des régions promotrices de la rénine humaine de tailles progressivement croissantes. Dans un souci de gain de temps, nous avons testé l'expression de ces constructions en « souris transitoires », en recherchant la localisation de l'expression de la  $\beta$ -galactosidase au 15<sup>e</sup> jour de gestation, période à laquelle la rénine commence à être exprimée au niveau du rein. L'analyse de ces souris montre pour la première fois une localisation spécifique rénale de la rénine et du transgène au cours du développement lorsque le transgène contient 12 Kb du promoteur humain de la rénine. Une lignée de souris obtenue avec ce transgène indique chez l'animal adulte, une localisation de la  $\beta$ -galactosidase dans les noyaux des cellules myoépithélioïdes produisant de la rénine au niveau des artérioles afférentes du glomérule rénal.



### 3. Transgénèse additive de l'aldostérone synthase au niveau cardiaque. Études phénotypiques

Nous avons débuté une collaboration avec l'équipe de C. Delcayre (U127) pour étudier le rôle du SRAA local au niveau du cœur. Pour cela nous avons choisi de surexprimer l'aldostérone synthase spécifiquement au niveau cardiaque. En effet, l'aldostérone pourrait avoir un rôle délétère dans le processus de cicatrisation lors de l'infarctus en favorisant l'apparition de fibrose. L'ADN complémentaire de l'aldostérone synthase de rat a été cloné et exprimé en cellules eucaryotes pour s'assurer de l'activité de la protéine produite. Puis l'ADNc a été sous-cloné dans un vecteur permettant son expression spécifique au niveau du cœur à l'aide du promoteur de l' $\alpha$ MHC (chaîne lourde alpha de la myosine). Nous avons obtenu trois fondateurs dont deux ont permis l'établissement de lignées qui sont en cours d'exploration. **Des résultats préliminaires sur les premiers animaux analysés indiquent une fibrose** ventriculaire, une légère augmentation de l'aldostérone plasmatique ainsi qu'une diminution du poids des surrénales.

### 4. Inactivation sélective *in vivo* par recombinaison homologue des domaines N- et C-terminaux de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA)

L'ECA dont le gène est en partie dupliqué, a deux sites catalytiques caractéristiques des métalloprotéases à zinc (domaine N- et C-terminaux). Des études de mutagenèse dirigée, respectivement sur l'un des deux sites des domaines N et C ont montré que ces deux sites étaient fonctionnels dans des expériences *in vitro*, mais qu'ils n'étaient pas identiques vis-à-vis de plusieurs substrats. Des expériences *in vitro* sont en cours pour essayer d'inactiver les sites des domaines N ou C de l'enzyme en utilisant des inhibiteurs sélectifs. Notre propos est également d'observer *in vivo* les conséquences liées à une enzyme n'ayant qu'un des deux sites catalytiques actifs, ceci par recombinaison homologue chez la souris.

Deux vecteurs de recombinaison ont été construits pour inactiver respectivement les sites N et C. Dans les deux cas les deux histidines du site catalytique ont été remplacées par deux lysines qui ne peuvent plus lier l'atome de zinc nécessaire à la catalyse. L'équipe du Dr. K. Bernstein (Emory University, Atlanta, USA) a inactivé le site du domaine N quant à nous, nous avons inactivé le site du domaine C-terminal. Dans cette dernière construction la cassette de sélection à la néomycine flanquée de deux séquences loxP, a été insérée afin qu'elle puisse être éliminée par la recombinase Cre après recombinaison homologue. La production de souris génétiquement modifiées devrait ainsi apporter *in vivo* des renseignements précieux sur la contribution respective de chacun des deux domaines de l'ECA aussi bien dans les systèmes rénine-angiotensine-aldostérone, kalicréine-kinine que dans l'érythropoïèse. De plus ces animaux seront un excel-

lent modèle pour tester *in vivo* de nouveaux inhibiteurs spécifiques de l'un des deux sites de l'ECA et ainsi d'espérer pouvoir dissocier l'action de chacun des deux domaines de l'ECA au sein d'un mécanisme physiologique déterminé. Il faut ajouter que ces souris permettront d'élucider les fonctions de l'ECA dans la fertilité masculine.

## 5. Métalloprotéase cryptique de la fibronectine

Le remodelage tissulaire intervenant au cours de nombreux processus physiopathologiques nécessite l'implication de protéases dont les mieux caractérisées appartiennent aux familles des métalloprotéinases matricielles (MMPs) et des sérines protéases. Leur action consiste notamment en la digestion des composants de la matrice extracellulaire conduisant à la libération de fragments protéiques dont certains portent des activités biologiques cryptiques. De telles activités cryptiques ont été décrites pour des fragments de plasminogène (angiostatine), de collagène XV (réstine) et XVIII (endostatine). Cela montre que les matrices extracellulaires jouent un rôle actif dans les processus de modelage en libérant les activités cryptiques qu'elles contiennent : en effet, des activités angiogéniques ou anti-angiogéniques, des facteurs de croissance (comme le FGF2) sont stockés dans les matrices extracellulaires qui semblent constituer un « réservoir » d'activités biologiques impliquées dans le modelage tissulaire.

La fibronectine est une glycoprotéine extracellulaire qui joue un rôle dans la prolifération et la migration cellulaire à travers ses propriétés d'adhésion et elle est impliquée dans l'embryogenèse, la cicatrisation et la néovascularisation. Nous avons montré, dans une étude *in vitro* antérieure, que cette protéine contient une métalloprotéase à zinc apparentée aux protéases matricielles MMP2 et MMP9. Cependant, la Fn-proteinase présente un profil d'inhibition spécifique. L'inhibiteur peptidique phosphinique [Z-F-ψ-(PO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)-A-R-F-OH], sans effet sur les MMPs, inhibe la Fn-proteinase, tandis que les TIMPs (inhibiteurs tissulaires naturels des MMPs) et le Batimastat (inhibiteur synthétique des MMPs), sont peu actifs. Cette enzyme est localisée dans le domaine liant la gélatine de la fibronectine. La protéase de la fibronectine est à ce jour la seule enzyme protéolytique stockée à l'état cryptique dans les matrices extracellulaires. L'existence d'une activité enzymatique cryptique portée par un fragment de fibronectine, protéine de la matrice extracellulaire, laisse entrevoir son implication possible dans le remodelage de la matrice extracellulaire intervenant au cours des pathologies vasculaires. Nous nous sommes attachés à mettre en évidence la présence de l'enzyme *in vivo* et à déterminer, en culture de cellules, les enzymes impliquées dans l'activation de la Fn-proteinase.

### *Mise en évidence de l'existence de la Fn-proteinase in vivo*

Dans le but de déterminer si la Fn-protéinase est présente dans les sérums, nous avons examiné l'activité de la Fn-proteinase dans les sérums de veau fœtal,

nouveau-né et bovin. L'hydrolyse du substrat Mca-P-L-G-L-Dpa-A-R-NH<sub>2</sub>, (substrat commun aux MMPs et à la Fn-proteinase) par les trois sérums, était inhibée de façon dose-dépendante par le peptide phosphinique inhibiteur, suggérant la présence naturelle de la Fn-proteinase dans les sérums. Comme le sérum de veau nouveau-né montrait à la fois une hydrolyse du substrat fluorescent et une inhibition par le peptide phosphinique inhibiteur plus importante que les autres sérums, nous avons entrepris la purification de la Fn-proteinase à partir de sérum de veau nouveau-né. La purification de la Fn-proteinase a été effectuée au moyen d'un tamisage moléculaire suivi par deux étapes de chromatographie d'affinité pour l'héparine puis pour la gélatine. La Fn-proteinase ainsi purifiée migrerait en une bande de masse moléculaire apparente de 63 kDa, déterminée après électrophorèse SDS-PAGE. Cependant, l'enzyme active apparaissait comme un oligomère de masse moléculaire élevée. En effet, après tamisage moléculaire du sérum, l'activité enzymatique associée à la Fn-proteinase se retrouvait dans les fractions de haute masse moléculaire et, en condition native, la Fn-proteinase purifiée migrerait sous la forme d'oligomères de haute masse moléculaire, auxquels était associée une activité gélatinase observée en gélatine zymographie. Les propriétés enzymatiques de la Fn-proteinase purifiée étaient similaires à celle de l'enzyme précédemment décrites *in vitro*. Le peptide phosphinique inhibait de façon dose-dépendante l'activité de la Fn-proteinase alors que les inhibiteurs des MMPs étaient peu actifs. Ces résultats constituent la première preuve de l'existence de la Fn-proteinase *in vivo*. La structure primaire de la Fn-proteinase purifiée est en cours de détermination par « peptide mapping », technique consistant à analyser en spectrométrie de masse les produits de la digestion enzymatique et/ou chimique de la Fn-proteinase purifiée et, à comparer leur masse avec les masses théoriques des fragments de la fibronectine dont la séquence est connue. La détermination des extrémités N-et-C terminales de la Fn-proteinase et la localisation précise de ce fragment de fibronectine dans la protéine native permettront une meilleure définition des enzymes responsables de l'activation de la Fn-proteinase, mais également la production d'une Fn-proteinase recombinante.

*Génération de la Fn-proteinase par les cellules musculaires lisses en culture :*

Les cellules musculaires lisses vasculaires (CMLVs) synthétisent les différents composants de la matrice extracellulaire ainsi que les protéases et antiprotéases matricielles. Aussi, ces cellules jouent un rôle important au cours des processus de modelage et de remodelage vasculaire. Ces cellules ont été choisies comme modèle cellulaire et des cultures primaires de CMLVs d'aorte thoracique de rat ont été établies. La fibronectine synthétisée par les CMLVs, cultivées en conditions basales, n'apparaît pas dégradée dans les milieux conditionnés ; de ce fait, aucune activité enzymatique de type Fn-protéinase n'a pu être mesurée dans ces milieux de culture. Comme l'activation de la Fn-protéinase nécessite une protéolyse ménagée de la fibronectine, nous avons recherché les enzymes responsables de la conversion *in vitro* de la fibronectine en Fn-protéinase parmi les enzymes

hydrolysant la fibronectine. Dans un premier temps, nous avons évalué l'activation de la Fn-protéinase par la thrombine, la plasmine et par les MMPs synthétisées par les CMLVs en conditions basales. Une augmentation de l'hydrolyse du substrat fluorescent inhibée par le peptide phosphinique a été observée lorsque la thrombine ou la plasmine ont été ajoutées aux milieux conditionnés en dose croissante. En revanche, aucune activité de type Fn-protéinase n'a été observée après activation des MMPs endogènes. Ces résultats suggèrent que la plasmine et la thrombine pouvaient activer la Fn-protéinase, contrairement aux MMPs synthétisées par les CMLVs. Dans un deuxième temps, nous avons reproduit, en cultivant les CMLVs en présence de plasminogène, la cascade enzymatique menant à l'activation de la Fn-protéinase par la plasmine. A l'aide d'un substrat fluorescent et d'un inhibiteur spécifique de la plasmine, nous avons mesuré l'activation du plasminogène en plasmine par les CMLVs cultivées en présence de plasminogène. La plasmine ainsi activée, conduisait à l'activation de la Fn-protéinase à partir de fibronectine. L'activation de la Fn-protéinase par la plasmine dépendait de la quantité de plasminogène ajoutée aux cellules. Ainsi, la modulation de la conversion du plasminogène en plasmine devrait conduire à la modulation de l'activation de la Fn-protéinase par la plasmine.

## II — MOLÉCULES IMPLIQUÉES DANS L'ANGIOGÈNESE PHYSIOLOGIQUE ET PATHOLOGIQUE

Équipe : J.-M. GASC, S. GERMAIN, N. LAMANDE, J. FAVIER, A. CRUZ, K. SAVARY, J. CELERIER, E. LARGER, M.-T. MORIN, F. MONGIAT, S. LEJAN

Un vaisseau sanguin conserve ou remodèle sa structure grâce à un équilibre précis entre de nombreux agents pro- et anti-angiogéniques. Ces agents incluent des facteurs de croissance et leurs récepteurs, des facteurs de transcription et leurs gènes cibles, des protéines de la matrice extra-cellulaire, des enzymes, etc. La préservation de l'intégrité vasculaire nécessite un contrôle strict de l'équilibre entre différents mécanismes régulés par ces agents : la perméabilité des vaisseaux, la prolifération et l'apoptose, la migration des cellules endothéliales et la stabilité de la matrice extra-cellulaire. Notre approche à la fois *in vitro* et *in vivo*, sur du matériel humain ou animal nous a mené à la découverte d'un nouveau facteur anti-angiogénique (l'angiotensinogène) et à la mise en évidence de nouvelles molécules impliquées dans le remodelage vasculaire défectueux dans deux pathologies (l'ischémie critique des membres inférieurs et les phéochromocytomes). Par ailleurs, une étude a débuté sur l'identification et la caractérisation de nouveaux gènes impliqués dans les processus d'hypoxie et d'angiogenèse.

### 1. L'angiotensinogène : un nouvel agent anti-angiogénique

Après avoir étudié le rôle stimulateur de l'endothéline 1 sur l'angiogenèse dans la membrane chorio-allantoïdienne de l'embryon de poulet nous avons

entrepris une étude sur un autre agent jouant un rôle de premier plan dans la régulation de la pression artérielle, l'angiotensinogène (AGT).

Bien qu'il n'ait pas d'action inhibitrice connue d'inhibiteur de sérine protéase, l'angiotensinogène, par sa structure moléculaire, ressemble à une serpine (inhibiteur de sérine-protéase). Trois autres serpines (anti-thrombine III, maspine, « Pigment Epithelial-Derived Factor » ou PEDF) ont un rôle anti-angiogénique, mis en évidence principalement par des tests *in vitro*. Il était donc possible de proposer que, en raison de sa structure moléculaire, l'AGT pouvait partager les propriétés anti-angiogéniques de ces trois autres serpines.

Utilisant les mêmes critères d'évaluation de l'activité anti-angiogénique que dans des études comparables publiées récemment sur les serpines, nous avons montré sur des cellules endothéliales en culture *in vitro*, que l'AGT inhibe *in vitro* la prolifération, la migration, et la capacité à projeter des prolongements cytoplasmiques qui reproduisent *in vitro* des structures de type vasculaire. De plus, le pouvoir anti-angiogénique de l'AGT a été révélé *in vivo* par la capacité à inhiber l'angiogenèse dans la membrane chorio-allantoïdienne de l'embryon de poulet. Pour tous ces tests d'activité anti-angiogénique, l'AGT se compare favorablement aux autres substances de la famille des serpines avec un  $EC_{50\%}$  sub-micromolaire sur les différents tests *in vitro* et *in vivo*. Cet effet est à rapprocher de la concentration plasmatique d'AGT circulant, de l'ordre de la micromole.

Afin d'attribuer ces propriétés à un domaine précis de la molécule, nous avons testé l'activité inhibitrice non seulement de l'AGT natif, c'est à dire la molécule complète, mais aussi du des(AngI)angiotensinogène (privé des dix acides aminés de l'angiotensine I à l'extrémité N-terminale) et de l'angiotensinogène clivé à l'extrémité C-terminale par la protéase V8. Ce découpage de la molécule permet aussi de distinguer les effets qui seraient dus à l'angiotensine I ou II de ceux dus à la partie centrale de l'AGT. Dans tous les cas utilisés dans cette étude les trois formes moléculaires de l'AGT ont montré des propriétés inhibitrices équivalentes sur les cellules endothéliales.

Nous poursuivrons ce travail par des études *in vivo* pour estimer la signification physio-pathologique de ces propriétés anti-angiogéniques de l'AGT, et par une étude des mécanismes en cause dans cet effet anti-angiogénique.

## 2. Ischémie des membres inférieurs

Nous avons poursuivi l'étude de l'angiogenèse dans un autre modèle qui constitue à la fois une pathologie assez fréquente pour laquelle il n'existe actuellement aucun remède vraiment efficace, et un modèle bien adapté pour analyser les conséquences *in vivo* de l'hypoxie : l'ischémie critique des membres inférieurs chez l'homme.

L'ischémie critique des membres inférieurs est une complication terminale fréquente et sévère de l'athérome puis de l'artériopathie oblitérante. A un stade avancé, la situation devient gravissime avec des troubles trophiques distaux, une nécrose tissulaire conduisant encore souvent à des amputations de membre inférieur. L'absence de traitement médical efficace jusqu'à présent a justifié la mise en place des tous premiers essais de thérapie angiogénique chez l'homme et justifie la recherche de nouvelles cibles thérapeutiques.

Nous avons entrepris une analyse des facteurs qui pourraient contribuer à une meilleure compréhension des causes et des mécanismes défectueux qui aboutissent à l'insuffisance critique de vascularisation.

L'analyse structurale et quantitative de l'architecture du réseau vasculaire nous a permis de mettre en évidence, chez 15 patients étudiés, une réduction significative de la densité capillaire dans le tissu ischémique (région distale de l'amputation) par rapport au muscle sain (région proximale), signe d'une néoangiogenèse inadaptée et insuffisante induisant une irrigation déficiente du tissu musculaire. Par ailleurs, une étude histo-moléculaire a révélé une sur-expression de la thrombospondine-1 au niveau ischémique. La thrombospondine-1 est une glycoprotéine de la matrice extra-cellulaire considérée comme un inhibiteur puissant de l'angiogenèse. Cette observation permet d'envisager une hypothèse inédite sur les mécanismes moléculaires qui, par déstabilisation de la balance entre acteurs pro- et anti-angiogéniques en faveur de molécules angiostatiques, pourraient conduire à l'absence de néovascularisation chez ces patients, en dépit de la condition hypoxique qui devrait susciter une re-vascularisation.

### **3. Expression de marqueurs angiogéniques dans les phéochromocytomes**

L'angiogenèse est apparue ces dernières années comme un événement crucial de la croissance tumorale. Cette capacité à former de nouveaux vaisseaux est l'objet de très nombreuses études visant à contrôler la néoangiogenèse pour maîtriser la croissance tumorale et les possibilités de métastase. Nous avons abordé cette question du rôle déterminant de l'angiogenèse tumorale par l'étude de marqueurs vasculaires dans les phéochromocytomes bénins et malins.

Les phéochromocytomes sont des tumeurs de la médullo-surrénale richement vascularisées. Notre objectif est d'une part d'identifier des marqueurs spécifiques de la vascularisation tumorale et d'autre part d'essayer de trouver des critères permettant de repérer un phéochromocytome bénin par des caractéristiques angiogéniques propres par rapport à une tumeur maligne qui a déjà métastasé.

L'absence actuelle de caractère distinctif entre phéochromocytome malin et bénin et le manque d'information sur l'expression des facteurs de croissance nous a incité à entreprendre une étude comparative de la structure du réseau vasculaire et du statut angiogénique de ces tumeurs. Nous avons étudié par hybridation in situ et/ou immunocoloration, l'expression de : la tyrosine hydro-

xylase, du « Vascular Endothelial Growth Factor » (VEGF) et de ses récepteurs R1 et R2, des « Hypoxia Inducible Factor » 1 $\alpha$  et 2 $\alpha$  (HIF1 $\alpha$  et HIF2 $\alpha$ /EPAS1), des angiopoïétines 1 et 2 et de leur récepteur Tie2, de l'enzyme de conversion des endothélines, des endothélines 1 et 3 et de leurs récepteurs ETA et ETB et enfin, d'un composant de la matrice extra-cellulaire, la thrombospondine I, connue pour ses propriétés anti-angiogéniques.

Cette étude a permis de montrer qu'il existait des différences structurales et moléculaires entre les phéochromocytomes bénins et malins. L'architecture vasculaire des tumeurs bénignes, quoique déjà altérée par rapport à la médullo-surrénale normale, apparaît en effet plus régulière que celle des tumeurs malignes qui présentent une densité capillaire moins importante et un plan d'organisation de la vascularisation très variable, certains secteurs étant envahis par des lacunes sanguines dont la morphologie ne ressemble pas à un type de vaisseau ordinaire. De plus, la comparaison semi-quantitative des différentes molécules étudiées a montré une surexpression de certains facteurs pro-angiogéniques tels que le VEGF, le facteur de transcription HIF2 $\alpha$ /EPAS1 ou le récepteur ETB des endothélines dans les phéochromocytomes malins par rapport aux bénins. Cette surexpression, d'un facteur égal ou supérieur à deux, est estimée au niveau tumoral (VEGF, HIF2 $\alpha$ ) et/ou endothélial (HIF2 $\alpha$ , ETB). L'ensemble de ces observations suggère donc qu'une suractivation des agents de l'angiogenèse conduit à une néovascularisation aberrante qui participe à la malignité de ces tumeurs.

#### **4. Identification et caractérisation de nouveaux gènes au cours de l'hypoxie**

L'objectif de ce projet est la recherche de nouveaux mécanismes moléculaires impliqués dans l'hypoxie cellulaire ou tissulaire ainsi que dans l'angiogénèse réactionnelle. Un intérêt particulier a été porté à deux situations pathophysiologiques où les processus angiogéniques, initiées par les cellules endothéliales, jouent un rôle fondamental : l'ischémie critique des membres inférieurs et l'angiogénèse tumorale. Cette étude a été initiée par criblage différentiel des ARNm de cellules endothéliales (HMEC) soumises à un stress hypoxique, inducteur d'angiogénèse, par rapport aux mêmes cellules cultivées en condition témoin (normoxie), par cDNA Representational Analysis (cDNA RDA). Deux cent cinquante gènes dont l'expression est induite par l'hypoxie ont déjà été identifiés ; trois quart correspondent à des gènes connus et un quart correspond à des ESTs (Expressed Sequence Tags). La caractérisation de l'expression différentielle de certains gènes a été effectuée par hybridation *in situ* sur des tissus de jambes de patients atteints d'ischémie critique des membres inférieurs en comparant les niveaux d'expression dans les territoires ischémiques par rapport au tissu sain (limite supérieur d'amputation). Ces 250 gènes seront déposés sur membrane de nylon de type Macroarray et seront hybridés avec des ADNc obtenus à partir

d'ARNm de cellules en hypoxie ou de tissus ischémiques/angiogéniques afin d'obtenir un patron d'expression génique des tissus ischémiques.

Cette approche est originale, elle combine une recherche de marqueurs prédictifs sur des modèles expérimentaux et pathologiques d'hypoxie. Elle devrait permettre d'identifier de nouveaux gènes impliqués dans la réponse à l'hypoxie et des marqueurs potentiels d'ischémie et(ou) d'efficacité de traitements anti-ischémiques. Enfin, cette recherche pourrait déboucher sur la mise au point d'outils diagnostiques ou de nouvelles cibles thérapeutiques.

### **III — ÉTUDE DU TRAFIC INTRACELLULAIRE ET DE L'ADRESSAGE DES ISOFORMES DE L'ENZYME DE CONVERSION DE L'ENDOTHÉLINE (ECE). EXPRESSION DE L'ECE ET DU SYSTÈME ENDOTHÉLINE EN PHYSIOPATHOLOGIE**

a) Équipe : C. TOUGARD, L. MULLER, R. MEIDAN, A. BARRET, E. ÉTIENNE,  
C. SOUNDARAMOURTY

L'enzyme de conversion de l'endothéline (ECE), l'enzyme-clé dans la formation d'endothéline active, existe sous la forme de quatre isoformes (ECE-1a, ECE-1b, ECE-1c et ECE-1d), protéines transmembranaires de type II qui ne diffèrent que par la partie N-terminale de leur court domaine cytoplasmique. Ces quatre métalloprotéases sont exprimées à des taux variables dans différents tissus et dans des modèles de cellules endothéliales en culture (Muller *et al.* 2000), mais l'isoforme ECE-1c est en général l'isoforme majoritaire. Nous avons précédemment montré que, dans des cellules CHO transfectées avec le cDNA codant respectivement pour chacune d'entre elles, les quatre isoformes présentent une distribution subcellulaire différente : alors que l'ECE-1a est principalement détectée à la surface des cellules, l'ECE-1b est majoritairement intracellulaire et l'ECE-1c et l'ECE-1d présentent une distribution intermédiaire (Valdenaire *et al.* 1999). La question fondamentale qui se pose alors est de comprendre le rôle physiologique joué par ces différentes isoformes à l'intérieur et à la surface des cellules. La régulation de l'expression de chacune d'entre elles pourrait intervenir dans une modulation fine de la formation locale d'endothéline.

L'objectif au cours de l'année écoulée a été d'approfondir l'analyse du trafic intracellulaire des quatre isoformes de l'ECE-1 dans deux modèles expérimentaux qui expriment, d'une manière endogène, de faibles taux d'ECE-1 : un modèle de cellules neuroendocrines hypophysaires, les cellules AtT20 et un modèle de cellules épithéliales polarisées, les cellules MDCK. Afin de pouvoir discriminer le tri et l'adressage de chaque isoforme, nous avons obtenu des lignées stables exprimant chaque isoforme marquée par une étiquette antigénique flag ou par une étiquette autofluorescente « green fluorescent protein » (GFP). Nous avons observé la même hétérogénéité de distribution subcellulaire que dans les cellules CHO. Nos recherches se sont donc poursuivies en relation avec la spécificité des modèles choisis.



## 1. Étude dynamique du trafic intracellulaire et de l'adressage des isoformes de l'ECE-1 dans les cellules AT20

Dans ce modèle cellulaire qui présente une voie constitutive et une voie régulée, aucune des isoformes de l'ECE-1 n'a été détectée dans les grains de sécrétion, ce qui indique une exportation des isoformes du réseau trans-golgien (TGN) vers la membrane plasmique ou vers les endosomes par l'intermédiaire de vésicules. De plus, contrairement aux isoformes 1a et 1c qui sont exprimées majoritairement à la surface des cellules, les isoformes 1b et 1d sont localisées en grande partie au niveau du système endosomal. En outre, chaque isoforme présente une cinétique de transport et de dégradation qui lui est spécifique. En particulier, l'ECE-1b est dégradée beaucoup plus rapidement que les autres isoformes. Un signal responsable de cette dégradation rapide de l'ECE-1b a été identifié par une approche de mutagenèse dirigée. Ces caractéristiques dynamiques distinctes associées à une distribution subcellulaire particulière sont extrêmement importantes si on les relie à une régulation de l'activité enzymatique de chaque isoforme.

## 2. Distribution des isoformes de l'ECE-1 dans les cellules MDCK polarisées

Les isoformes de l'ECE-1 étant exprimées *in vivo* dans des cellules endothéliales et dans des cellules épithéliales qui, placées dans leur environnement physiologique, sont polarisées, il était fondamental d'étudier l'adressage des isoformes dans des cellules polarisées et nous avons choisi un modèle pilote : les cellules MDCK. Dans ce modèle cultivé en monocouche dans des conditions où les jonctions serrées sont bien établies et stabilisées, la distribution subcellulaire de chaque isoforme a été analysée et comparée à la distribution de deux autres métalloprotéases, l'endopeptidase neutre (NEP) connue pour être exclusivement apicale et l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE) pour laquelle il existe peu de données.

Les informations recueillies indiquent des différences d'adressage des isoformes 1a, 1c et 1d vers les domaines apicaux et/ou basolatéraux de la membrane plasmique alors que l'isoforme 1b est intracellulaire, la NEP complètement apicale et l'ACE principalement apicale. Il nous reste à mener maintenant une étude dynamique du transport intracellulaire des isoformes pour comprendre comment s'effectuent leur éventuelle transcytose ou leur endocytose et leur stabilisation à la surface des cellules en relation avec leur rôle physiologique.

b) Équipe : F. PINET

### 1. Distribution et caractérisation du système endothéline

Nous avons étudié l'expression de la préproET-1 (PPET-1), de l'ECE-1 et des récepteurs ETA et ETB dans le colon normal par hybridation *in situ* et

immunohistochimie. Nous avons montré la présence de tous les éléments du système endothéline dans le colon sain. Ceci suggère une implication du système endothéline dans certaines fonctions du colon ET-1 pourrait être un neuropeptide et un peptide vasoconstricteur dans la muqueuse normale (Egidy *et al.*, 2000).

## 2. Rôle du système endothéline au cours de l'angiogenèse

L'implication physiopathologique possible de l'ECE et du système endothéline a été étudiée dans divers modèles d'angiogenèse physiologique et tumorale. Des prélèvements obtenus à partir de tumeurs de colon (collaboration avec le Dr L. Juillerat-Jeanneret, Lausanne, Suisse), nous ont permis d'étudier l'expression du système endothéline par hybridation *in situ* dans le tissu sain adjacent, le tissu où début l'infiltration cancéreuse (stade adénome) et le tissu cancéreux. Nous avons montré une surexpression de tout le système endothéline au stade invasif comparé au tissu normal. Ces résultats ont été confirmés en utilisant un modèle expérimental d'induction de cancer de colon chez le rat (collaboration avec le professeur J.-F. Jeannin, INSERM U517/EPHE) et suggèrent que l'ET-1 et ses récepteurs jouent un rôle dans la progression du cancer de colon, l'ET-1 fonctionnant comme un modulateur négatif dans la réponse du stroma (Egidy *et al.*, 2000).

L'utilisation de lignées de cellules originaires d'un carcinome de colon nous a par ailleurs permis de montrer que l'endothéline pourrait être un facteur de survie pouvant protéger les cellules contre l'apoptose induit par Fas ligand (Pedeutobert *et al.*, 2000).

Dans un modèle de tumeurs cérébrales, les glioblastomes, nous avons montré le rôle important du récepteur ETB au niveau des cellules tumorales après son activation par l'ET-1, qui est sécrétée à partir des vaisseaux tumoraux. Le traitement de cellules dérivées du glioblastome par le bosentan, antagoniste mixte des récepteurs ET, a montré que l'ET-1 via ETB serait un facteur de survie, anti-apoptotique, produit par les vaisseaux de la tumeur, mais par contre ET-1 ne serait pas un facteur de prolifération (Egidy *et al.*, 2000).

Dans le même type de tumeurs, nous avons aussi évalué l'expression des composants du système rénine-angiotensine. Une activité élevée de l'aminopeptidase A (APA) a été observée au niveau des vaisseaux tumoraux, suggérant la possibilité de génération d'angiotensine III. Ces résultats et des expériences de régulation des cellules endothéliales par le TGF- $\beta$  suggèrent que l'APA est un marqueur du dysfonctionnement de la barrière hémato-encéphalique, mais pas de la néovascularisation, du fait de la perte de régulation par le TGF- $\beta$  (Juillerat-Jeanneret *et al.*, 2000).

Dans les hyperaldostéronismes primaires tumoraux (obtenus grâce au réseau COMETE), nous avons cherché la présence d'un système endothéline local au niveau de la surrénale. Nous avons choisi les tumeurs de Conn car il existe une hyperplasie du cortex, région où nous avons montré la plus forte expression

d'ECE-1. Les deux récepteurs, ETA et ETB sont présents ainsi que l'ECE-1 en grande concentration, par contre nous n'avons pas pu mettre en évidence de synthèse locale de PPET-1. Ceci suggère la présence d'un autre substrat pour l'ECE au niveau des surrénales et que l'endothéline n'est pas la première cause de développement ou de maintien de l'adénome de Conn (Egidy *et al.*, 2001).

### **3. Étude des propriétés de signalisation de mutants naturels du récepteur de type B à l'endothéline (ETB) découverts chez des patients atteints de la maladie de Hirschsprung**

La maladie de Hirschsprung (mégacôlon aganglionnaire) est une malformation congénitale du colon très fréquente (une naissance sur 5 000). La maladie est liée à une absence d'innervation d'une portion de l'intestin terminal qui apparaît normalement au cours du développement embryonnaire. Le mécanisme communément accepté suppose un maintien à un état indifférencié des cellules tout au long de leur migration grâce, en particulier, à l'activation du récepteur (ETB) par l'endothéline 3 (ET-3). Des mutations du gène ETB ont été retrouvées dans 5 % des cas et nous avons étudié la fonctionnalité de trois mutations faux-sens identifiées par le professeur S. Lyonnet (INSERM U393 — Hôp. Necker Enfants Malades, Paris) de ce récepteur dans des cas sporadiques de la maladie : les mutations G57S, R319W et P383L, localisées respectivement dans le domaine extra-cellulaire, la troisième boucle intracellulaire et à la jonction du septième domaine transmembranaire avec le domaine intracellulaire

La signalisation intracellulaire de ces différents mutants après expression stable ou transitoire dans les cellules CHO et HEK 293 a été effectuée. Par immunohistochimie, nous avons montré que le mutant P383L n'était pas exprimé à la membrane et que par conséquent il n'était pas fonctionnel. Par contre les mutants G57S et R319W sont exprimés à la périphérie des cellules et sont internalisés en présence d'agoniste (ET-1) de la même façon que le récepteur ETB sauvage. Les voies de signalisation par le calcium intracellulaire et l'activation des facteurs AP-1 sont normales dans les deux autres mutants. Par contre, le couplage de ces récepteurs à la voie AMPc est anormal. Alors que l'activation du récepteur sauvage induit une inhibition de la production d'AMPc, le mutant R319W n'a aucun effet sur le niveau d'AMPc et le mutant G57S induit une augmentation de l'AMPc due à un couplage à une protéine Gs sensible à la toxine de Pertussis. Ces résultats suggèrent un rôle central de la signalisation intracellulaire via l'AMPc dans les cellules qui contribuent à la mise en place de l'innervation du colon (Fuchs *et al.*, 2001).

#### IV — FONCTIONS MOLÉCULAIRES ET SIGNALISATION DES RÉCEPTEURS MEMBRANAIRES DE L'ANGIOTENSINE II

Équipe : E. CLAUSER, C. ARDIDIE, G. ASSIE, C. AUZAN, S. BARDIN, S. BILLET, S. CONCHON, C. DUGOURD, S. MISEREY, C. MONNOT et B. SAUBAMEA

L'activité du groupe a porté sur l'analyse du fonctionnement moléculaire des récepteurs membranaires de l'angiotensine II. Ces études se poursuivent vers l'analyse des interactions protéiques moléculaire de ces récepteurs et de leurs voies de signalisation grâce à des techniques de biologie moléculaire et cellulaire et de biophysique.

##### 1. Récepteurs des peptides vasoactifs

Les récepteurs de l'AngII (AT humain, AT<sub>1</sub> et AT<sub>1B</sub> de rat, AT<sub>2</sub> de rat), qui nous servent de modèle sont des récepteurs heptatransmembranaires couplés à des protéines G, qui ont été clonés. Grâce aux ADNc de ces récepteurs, nous avons étudié la pharmacologie moléculaire, certains rapports entre structure et fonctions, les interactions protéiques et la signalisation de ces récepteurs par différentes approches.

a) Nous avons développé plusieurs **modèles d'étiquetage du récepteur AT<sub>1A</sub>** de rat en l'absence d'anticorps spécifiques contre cette protéine. La réalisation d'une protéine de fusion récepteur AT<sub>1A</sub>-EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein) permet l'expression d'un récepteur fonctionnel, facilement identifiable par Western blot, immunoprécipitation et histochimie. Nous avons pu ainsi analyser la colocalisation membranaire du récepteur et de sa protéine Gq/11, et l'évolution de leurs distributions subcellulaires lors de la liaison au récepteur de composés agonistes ou antagonistes. Nous avons ainsi montré que (i) l'augmentation de l'expression membranaire du récepteur AT<sub>1</sub> s'accompagnait d'un recrutement membranaire de la protéine Gq, que (ii) l'application d'AngII entraînait la translocation simultanée des 2 protéines dans des compartiments intracellulaires différents et qu'enfin (iii) la translocation agoniste dépendante de la protéine Gq dépendait de l'internalisation du récepteur et non du couplage entre les deux protéines.

Ces récepteurs étiquetés fonctionnels nous permettent de développer nos travaux de recherche dans 2 directions complémentaires :

- L'étude directe de la dimérisation homologue et hétérologue du récepteur AT<sub>1</sub> ; nous avons ainsi identifié une dimérisation homologue par la technique BRET et par coimmunoprécipitation. Le rôle de cette dimérisation reste à préciser, de même qu'une interaction fonctionnelle entre AT<sub>1</sub> et AT<sub>2</sub>, qui pourrait être due à une interaction au niveau des récepteurs.
- L'analyse des interactions protéine-protéine mises en évidence par co-immunoprécipitation et FRET entre le récepteur AT<sub>1</sub> et d'autres protéines de signalisation, de désensibilisation et de trafic.

Ces travaux en cours sont complétés par le clonage par double hybride et la recherche par une autre technique chez la levure de nouvelles protéines interagissant avec les segments intracellulaires du récepteur AT<sub>1</sub>.

b) Parallèlement à ces travaux nous nous intéressons aux **mécanismes d'activation du récepteur AT<sub>1</sub>**. Nous avons identifié des mutations activant de façon constitutive ce récepteur à l'aide d'une banque mutationnelle du récepteur AT<sub>1</sub> et du criblage de cette banque par un test fonctionnel d'activation constitutive. Ces mutants se sont révélés constitutivement internalisés, un nouveau phénomène réversible par les agonistes inverses et qui peut physiologiquement modifier la signalisation de ces récepteurs mutés. De tels mutants constitutivement actifs seront exprimés dans la surrenale d'animaux transgéniques afin de juger de leur rôle tumorigène. De plus un double mutant (constitutivement actif (N111S) et hyperactif ( $\Delta$ 329)) sera exprimé par transgénèse substitutive. Une telle construction se termine et sera insérée par recombinaison homologue dans les cellules ES de la souris.

L'étude des voies de signalisation du récepteur AT<sub>1</sub> et en particulier de l'importance de la voie PI3kinase/Akt dans les actions prolifératives de l'angiotensine II a été poursuivie. Nous avons montré que la phosphorylation et l'activité de l'Akt sont spécifiquement stimulées en réponse à l'AngII par l'intermédiaire du récepteur AT<sub>1</sub> et possèdent une cinétique différente de la cinétique d'activation des Erk1/Erk2. De plus, ces deux voies de phosphorylation des sérines kinases sont impliquées dans la réponse proliférative de l'AngII par l'intermédiaire des récepteurs AT<sub>1</sub>.

## 2. Gènes impliqués dans la tumorigénèse surrenalienne

Enfin et dans ce cadre de la tumorigénèse surrenale, nous avons entrepris l'étude des transcriptomes de la corticosurrenale normale (glomérulée) et tumorale (adénome de Conn) par la technique SAGE mise au point au laboratoire. Les séquençages des banques sont en cours et devraient permettre une étude comparative de ces banques. De plus l'étude des transcriptomes des tumeurs de la corticosurrenale par une étude exhaustive de 100 tumeurs par « DNA chips » dans le cadre du projet national de la Ligue contre le Cancer « Carte d'Identité des tumeurs » ou CIT2, pour lequel notre projet a été sélectionné.

## V — ÉTUDE DE L'ORGANISATION ET DU RÔLE FONCTIONNEL DU SYSTÈME RÉNINE-ANGIOTENSINE CÉRÉBRAL : MÉTABOLISME ET RÉCEPTEURS

Équipe : C. LLORENS-CORTÈS, A. HUS-CITHAREL, N. DE MOTA, A. RÉAUX, X. ITURRIOZ, R. ROZENFELD, S. EL MESSARI, D. DJORDJJEVIC

Le principal thème de recherche de ce groupe de travail est l'étude de l'organisation et du rôle fonctionnel du système rénine angiotensine (SRA) cérébral dans

le contrôle central de la pression artérielle et la sécrétion des hormones hypophysaires.

L'aminopeptidase A (EC 3.4.11.7, APA) qui convertit l'AngII en AngIII sera étudiée en détail.

Parallèlement, deux nouveaux thèmes de recherche sont en émergence, et concerne l'identification de ligands endogènes de récepteurs orphelins à 7 domaines transmembranaires (GPCRs) présents dans le SNC et l'étude d'un nouveau neuropeptide, l'apeline.

## 1. Ectoenzymes et métabolisme de l'AngII en AngIII

### *Organisation du site actif de l'APA*

#### *a. Objectif*

Une définition approfondie du rôle physiologique de l'APA nécessite l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques et sélectifs. La structure de ces molécules peut-être définie à partir de la modélisation de son site actif. En l'absence de données cristallographiques sur l'APA et sur les aminopeptidases, on connaît peu de choses sur l'organisation du site actif de ces enzymes. Par comparaison avec la thermolysine, une endopeptidase à zinc dont la structure et l'organisation du site actif sont connus, nous avons tenté de caractériser certains acides aminés impliqués dans l'activité catalytique, la liaison du zinc, du calcium ou du substrat, par mutagenèse dirigée et expression des protéines recombinantes dans des cellules eucaryotes.

#### *b. Travaux réalisés : Identification d'un nouveau motif impliqué dans la spécificité exopeptidasique de l'APA*

L'aminopeptidase A (EC 3.4.11.7 ; APA) est une exopeptidase membranaire homodimérique de 160 kDa qui contient la séquence consensus HEXXH (385-389) caractéristique de la famille des métalloprotéases à zinc. L'APA clive spécifiquement les acides aminés acides situés en position N-terminale des peptides comme l'angiotensine II. L'alignement de la séquence primaire de l'APA de souris avec celles de différentes aminopeptidases monozincs montre la présence d'un motif XXMEN (349-353) strictement conservé dans toutes ces enzymes. L'étude par mutagenèse dirigée du rôle fonctionnel du glutamate 352 de ce motif a démontré l'implication de ce résidu dans la spécificité exopeptidasique de l'APA. Pour poursuivre l'étude du motif XXMEN, nous avons substitué l'asparagine 353 par une glutamine, une alanine et un aspartate, par mutagenèse dirigée. Après avoir exprimé les APAs sauvage et mutantes dans des cellules CHO, la maturation des APAs mutées a été comparée à celle de l'APA sauvage par marquage métabolique suivie d'une immunoprécipitation à l'aide d'un anticorps reconnaissant l'APA. Les mutations de l'asparagine 353 en glutamine et en

alanine ne perturbent pas la maturation, alors que la mutation en aspartate entraîne l'expression d'une enzyme instable partiellement glycosylée. L'étude des paramètres cinétiques des enzymes recombinantes purifiées en présence de différents substrats synthétiques et naturels (glutamate- $\beta$ -naphthylamide, aspartate- $\beta$ -naphthylamide, et angiotensine II) montre une diminution de l'affinité et de la constante catalytique pour les deux mutants en glutamine et en alanine par rapport à l'APA sauvage, entraînant une diminution de la vitesse d'hydrolyse d'un facteur 20. Pour préciser le rôle de l'asparagine 353, nous avons évalué les effets des mutations sur le pouvoir inhibiteur de différents analogues du glutamate, qui interagissent avec le site actif de l'APA par leur fonction amine N-terminale et par leur chaîne latérale acide. La comparaison des pouvoirs inhibiteurs de ces composés présentant soit les deux types d'interaction (L-GluPO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>, Glutamate-thiol), soit l'interaction via la chaîne latérale (D-GluPO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>), soit l'interaction via l'amine N-terminale (Glutamine-thiol), nous a permis de proposer un modèle dans lequel l'asparagine interagirait d'une part, avec l'amine N-terminale du substrat, et d'autre part, avec la chaîne latérale acide du substrat. Ces résultats mettent en évidence l'implication du motif XXMEN dans la spécificité exopeptidase de l'APA et des aminopeptidases monozincs.

### *Effets des inhibiteurs de l'APA sur la pression artérielle*

La synthèse d'inhibiteurs spécifiques de l'APA est déterminante pour estimer son rôle fonctionnel. La conception et la synthèse de ces produits sont effectuées dans l'U266 de l'INSERM dirigée par B. Roques (Équipe de M-C. Fournié-Zaluski). Le test d'activité de ces produits sur l'APA recombinante purifiée (produite au laboratoire), sur le métabolisme de l'AngII *in vitro* et *in vivo*, ainsi que leurs effets sur différentes réponses physiologiques seront réalisés à l'Unité 36 de l'INSERM.

Les produits les plus intéressants obtenus dans cette étude sont les suivants :

- l'**EC33** : (R,S) 3-amino-4-thio-butyl sulfonate, inhibiteur spécifique de l'APA (son pouvoir inhibiteur est 100 fois meilleur pour l'APA ( $K_i = 0,29 \mu\text{M}$ ) que pour l'APN).
- l'**EC27** : (S) 2-aminopentane-1,5 dithiol, inhibiteur sélectif de l'APN (son pouvoir inhibiteur est 100 fois meilleur pour l'APN ( $K_i = 0,032 \mu\text{M}$ ) que pour l'APA).

Il est bien établi que l'injection par voie i.c.v. d'AngII ou d'AngIII induit une augmentation de la pression artérielle. Les expériences réalisées avec l'EC33 et l'EC27 chez le rat normotendu et le rat spontanément hypertendu (SHR) ont montré que l'AngIII est le peptide effecteur du SRA cérébral dans le contrôle central de cette fonction, et que le blocage de l'APA cérébrale par cet inhibiteur provoque une chute de la pression artérielle (Réaux *et al.*, 1999).

Le rat SHR représente le type même de l'hypertension artérielle (HTA) essentielle humaine. Il n'est pas sensible au sel ; le système rénine-angiotensine circu-

lant et intrarénal est similaire chez l'animal hypertendu et chez les témoins normotendus. A l'inverse, il existe une hyperactivité du SRA cérébral. Ce modèle est en revanche très sensible aux vasodilatateurs. Dans cette souche, les inhibiteurs de l'enzyme de conversion, comme les inhibiteurs des canaux calciques, normalisent la pression.

A l'opposé, le rat DOCA-sel (unilatéralement nephrectomisé) développe une hypertension, secondaire à l'administration de l'acétate de désoxycorticostérone (DOCA) et à un régime riche en sel. Dans ce modèle, l'HTA dépend du sel et plus précisément de la concentration en sel du milieu extracellulaire et peut-être intracellulaire. Ici, le sel joue un rôle presseur, en association avec les minéralocorticoïdes. Le modèle est caractérisé par une volémie élevée et un taux circulant d'activité rénine très bas. Sur le plan pharmacologique, il se caractérise par sa résistance aux inhibiteurs du système rénine-angiotensine et par sa sensibilité aux inhibiteurs des canaux calciques.

Ce modèle est intéressant car le système rénine-angiotensine périphérique n'est pas impliqué dans l'élévation de la PA. Il est donc très important de voir si un inhibiteur de l'APA pourrait avoir un effet anti-HTA, du fait de l'inhibition du SRA central. Une première série d'expériences a consisté à injecter l'EC33 seul (par voie i.c.v.) et à enregistrer en continu la pression artérielle (PA) ainsi que la fréquence cardiaque après cathétérisme de l'artère fémorale, chez l'animal vigile. Les premiers résultats indiquent que le blocage de la formation de l'AngIII cérébrale dans ce modèle entraîne une baisse importante de la PA. Dans un deuxième temps, des courbes dose-réponse seront effectuées afin de confirmer ces données. Puis nous étudierons les effets d'injections répétées de cet inhibiteur (par voie i.c.v.) sur la PA afin de déterminer s'il y a ou non développement d'une tolérance à son action hypotensive. Parallèlement, les chimistes travaillent à la synthèse d'inhibiteurs de l'APA capables de pénétrer dans le cerveau ; Ces molécules seront injectées par voie i.v. à différentes doses et la PA sera enregistrée. Ceci permettra : 1/ d'évaluer l'effet hypotenseur central de ces molécules qu'elles soient injectées par voie centrale ou systémique ; 2/ de vérifier que ces molécules n'ont pas d'action à la périphérie sur la pression artérielle.

Si cette hypothèse se vérifie, l'APA pourrait constituer une nouvelle cible thérapeutique, justifiant le développement d'inhibiteurs de l'APA actifs par voie orale comme antihypertenseurs centraux.

## **2. Récepteurs de l'AngII / AngIII de type-1 ( $AT_{1A}$ et $AT_{1B}$ ).**

### ***Interaction entre les voies de signalisation de l'angiotensine II (AngII) et de la bradykinine (BK) dans la branche large ascendante corticale de rein de rat (CTAL)***

Les récepteurs de l'AngII de type 1A ( $AT_{1A}$ ) et de la BK ( $B_2$ ) sont colocalisés dans le CTAL. Le but de ce travail a été d'examiner dans ce segment 1) les



interactions entre les récepteurs  $AT_{1A}$  et  $B_2$  en étudiant les effets d'une pré-stimulation par la BK sur les augmentations de calcium intracellulaire induites par l'AngII et réciproquement et 2) l'action de l'AngII et de la BK en mesurant la production de  $CO_2$  métabolique à partir de lactate [ $U^{14}C$ ], un reflet du transport actif de sodium.

Les courbes « dose-réponse » effectuées en présence d'AngII montrent qu'une pré-stimulation par 100 nM de BK diminue significativement la réponse calcique maximale sans modifier les valeurs de  $EC_{50}$ . En revanche, une pré-stimulation par 100 nM AngII, ne modifie pas la courbe dose-réponse effectuée en présence de BK. Le HOE 140, un antagoniste du récepteur  $B_2$ , abolit totalement la réponse calcique à la BK, sans modifier la réponse successive induite par l'AngII. Le losartan, un antagoniste du récepteur  $AT_{1A}$  abolit la réponse calcique induite par l'AngII mais n'altère pas la réponse successive à la BK. L'application simultanée de 100 nM d'AngII et de BK entraîne une augmentation de calcium qui n'est pas significativement différente de l'effet additif théorique des deux peptides. Ce résultat suggère que les voies d'entrée du calcium et/ou la libération du calcium intracellulaire stimulées par l'AngII et la BK sont différentes et que l'inhibition de la réponse à l'AngII induite par une première application de BK n'est pas due à la déplétion des réserves intracellulaires de calcium. Cette inhibition est PKC-indépendante puisqu'elle persiste en présence de bisindolylmaléimide, un inhibiteur de la PKC. L'AngII augmente la production de  $CO_2$  métabolique de 57 %, alors que la BK l'inhibe de 33 %.

Ces données montrent que dans le CTAL, non seulement l'AngII et la BK ont des effets opposés sur le transport de sodium mais aussi que l'action de l'AngII peut-être modulée par la BK, possiblement via une interaction directe entre les récepteurs  $AT_{1A}$  et  $B_2$ , résultant en une inhibition des augmentations de calcium intracellulaire induites par l'AngII.

## VI — GÉNÉTIQUE MOLÉCULAIRE DE L'HYPERTENSION ARTÉRIELLE HUMAINE

Équipe : X. JEUNEMAITRE, A.-M. HOUOT, A.-P. GIMENEZ-ROQUEPLO, J. LU\*,  
D. CHISTIakov\*, S. DISSE-NICODEME, I. DESITTER, P.-F. PLOUIN

\* Chercheurs post-doctorants arrivés en février et avril 2001.

### 1. Étude de gènes candidats dans l'HTA essentielle

#### *Le canal Na épithélial amiloride-sensible et ses partenaires*

Le canal Na épithélial sensible à l'amiloride (ENaC) contrôle la réabsorption finale du Na au niveau du tube contourné distal. Il est constitué de trois sous-unités  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ , toutes nécessaires à sa fonction. Des délétions portant sur la partie C-terminale des sous-unités  $\beta$  et  $\gamma$  sont responsables d'une augmentation du courant Na au niveau de la cellule tubulaire distale et de formes rares mais

caricaturales d'HTA avec inflation hydrosodée et rénine basse (syndrome de Liddle). L'hypothèse que nous avons formulée était celle de la présence de mutations sur l'une ou plusieurs des sous-unités de ENaC dans l'HTA essentielle. Nous avons identifié plusieurs polymorphismes sur chacun des gènes des 3 sous-unités sur plusieurs groupes d'hypertendus d'origine ethnique différente, et testé leur fonctionnalité *in vitro* par injections d'ARNc dans des œufs de Xénope. Il n'existe pas à l'heure actuelle d'arguments forts suggérant la fonctionnalité de ces polymorphismes. Il est à noter que le polymorphisme T594M de  $\beta$ ENaC a été retrouvé associé à l'hypertension artérielle chez des sujets de race noire et que le polymorphisme W493R de  $\alpha$ ENaC est situé dans une région conservée de la boucle extracellulaire suggérant une possible fonctionnalité.

*Serum Glucocorticoid Kinase (SGK), isoformes de Nedd-4, protéines à domaine WW*

Plusieurs protéines intracytoplasmiques peuvent participer à la régulation de ENaC et donc à la régulation du bilan hydrosodé. La Serum Glucocorticoid Kinase (SGK) est une protéine kinase induite par l'aldostérone exerçant un effet positif et rapide sur l'activité de ENaC. Nous avons fait un criblage systématique de cette kinase par amplification de chaque exon du gène et rechercher de variants moléculaires par SCCP dans un groupe de 50 sujets hypertendus à rénine basse. Deux polymorphismes ont été retrouvés mais aucune mutation délétère. Nous poursuivons actuellement l'étude par l'analyse plus systématique de la région du domaine PY de SGK susceptible d'interagir avec Nedd-4. Deux isoformes de Nedd-4 ainsi que plusieurs protéines à domaine double tryptophane (WW) interagissent avec la partie C-terminale des sous-unités de ENaC participant ainsi à la régulation de leur dégradation. Récemment, l'équipe de O. Staub à Lausanne a montré que l'isoforme 2 de Nedd-4 était probablement celle qui interagissait avec ENaC. Notre stratégie est d'effectuer une analyse moléculaire de Nedd-4-2 sur des sujets hypertendus dont le profil tensionnel, biologique et hormonal fait fortement suspecter une réabsorption excessive de sodium. Cette étude systématique est en cours.

## **2. Étude de phénotypes intermédiaires chez des fratries hypertendus**

L'étude phénotypique détaillée de paires de germains hypertendus entreprise depuis 1994 a pour objectif l'étude de la liaison, par la méthode des germains affectés, entre des gènes candidats et des phénotypes intermédiaires impliqués dans la régulation de la pression artérielle (système rénine angiotensine, système kalicréine-kinine, réponse au sel, sécrétion d'aldostérone, contre-transport Na/Li).

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-cholestérol 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. Des relations génotype-phénotype sont effectuées pour chacun des gènes codant pour les phénotypes intermédiaires correspondants. Le polymorphisme M235T du gène de l'AGT est très significativement associé au phénotype de non-modulation. Les corrélations familiales du niveau de rénine ont justifié la mise en place d'un protocole de réponse à l'administration d'un antagoniste des récepteurs de l'AngII chez des fratries hypertendues au CIC de l'HEGP.

Nous avons également poursuivi une étude de génétique moléculaire du système kallibréine-kinine. Une relation négative existe entre la pression artérielle et le niveau d'excrétion urinaire de kallibréine dont environ 50 % de la variance est génétiquement déterminé. L'étude d'un marqueur microsatellite du kininogène (substrat du système) ne montre pas de liaison génétique avec l'hypertension artérielle essentielle. La recherche de polymorphismes au niveau du gène de la kallibréine rénale s'est avérée positive. Un des polymorphismes aboutissant à un changement d'acide aminé (R53H) est associé à une baisse de l'excrétion urinaire de kallibréine. Dans le cadre d'une collaboration avec l'U367, nous avons pu montrer que ce polymorphisme R53H avait un effet net sur l'activité enzymatique de la kallibréine mutante recombinante. Son impact *in vivo* sera analysé dans le cadre d'un protocole effectué chez des normovolontaires au CIC de l'HEGP.

### **3. Analyse d'une forme autosomique dominante d'hypertension artérielle essentielle**

L'hypertension artérielle (HTA) représente l'exemple même d'une maladie complexe, soumise à des facteurs génétiques et environnementaux divers, dont il est très difficile d'identifier les gènes de susceptibilité. Une alternative est l'identification des gènes impliqués dans certaines formes caricaturales d'HTA, dont la transmission mendélienne facilite l'analyse génétique. Bien qu'elles ne représentent qu'un pourcentage très faible des hypertendus, ces formes mendéliennes ont en effet permis dans les années précédentes des avancées considérables dans la compréhension moléculaire de l'élévation de la pression artérielle.

Le projet que nous avons poursuivi est axé sur l'Hypertension Hyperkaliémique Familiale (HHF), encore appelée syndrome de Gordon ou pseudohypoaldostérisme de type II (PHA2), une forme autosomique dominante d'HTA, caractérisée par un tableau biologique très particulier associant hyperkaliémie, acidose métabolique et hyperchlorémie en l'absence de toute insuffisance rénale et pour laquelle les anomalies biologiques suggéraient une anomalie rénale primaire, en

particulier un dysfonctionnement du cotransporteur NaCl (gène SLC12A3) au niveau du tubule distal rénal, mais pour lequel aucune anomalie moléculaire n'avait pu être mise en évidence. La stratégie génétique prenait dès lors tout son sens, avec la recherche de loci pouvant orienter sur de nouveaux gènes candidats.

Notre laboratoire a pu analyser 4 familles françaises avec pour chacune une transmission autosomique dominante de la maladie et débiter une recherche de liaison génétique. Nous avons en particulier caractérisé une grande famille du Nord de la France (40 individus) dans laquelle la pathologie ségrégeait selon le mode autosomique dominant. Un screening complet du génome à partir des ADNs de cette famille la plus informative nous a permis d'identifier un nouveau locus appelé PHA2-C (Lodscore = 6.2 à  $\theta = 0$ ). L'analyse des candidats positionnels (sous-unité  $\alpha$  du canal Na épithélial, canaux potassiques, sous-unité  $\beta$ 3 de la protéine G) s'est avérée négative.

Les problèmes d'hétérogénéité génétique de la maladie, le fait que nous ne disposions que d'une seule famille suffisamment large pour être exploitable en étude de liaison génétique, nous ont encouragé à rechercher d'autres familles atteintes. L'analyse des cas rapportés dans la littérature nous a permis d'obtenir des informations sur 15 familles pour lesquelles au moins un sujet présente un tableau clinique et biologique typique de la maladie. Parmi ces 15 familles, sept d'entre elles comportent au moins deux sujets atteints et ont permis l'analyse de l'hétérogénéité clinique et biologique de la maladie. Les relations phénotypes/familles ont montré une grande variabilité intra-familiale mais aussi interfamiliale faisant suspecter une sévérité différente en fonction du locus atteint.

Parallèlement à ce travail de recrutement de familles, nous avons poursuivi l'analyse moléculaire du locus PHA2-C. L'extension de la famille-4 et une analyse génétique plus approfondie ont abouti à une définition très précise de la région d'intérêt (moins de 1 cM). Nous avons effectué pendant 6 mois un travail de cartographie physique de la région, région pour laquelle les données disponibles dans les bases de données génétiques étaient très incomplètes. Entre temps, l'équipe américaine de R. Lifton (Yale) avait progressé dans l'identification du gène dans une forme de HHF similaire à la nôtre. Nous avons donc décidé de collaborer avec ce laboratoire. Nous avons ainsi identifié dans notre famille une délétion dans l'intron 1 du gène d'une kinase, WNK1, dont la fonction n'était pas connue, délétion incluse dans la délétion 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, en particulier au locus PHA2B, a montré la présence d'autres mutations faux-sens chez d'autres familles atteintes. L'expression de ces kinases dans le tubule rénal distal confirme leur rôle très probable dans l'homéostasie du sodium et du potassium et surtout identifie une nouvelle classe de gènes dans la régulation de la pression artérielle.

La collection de familles supplémentaires nous a permis de tester la liaison entre les sujets atteints de trois familles et les trois loci candidats, PHA2-A

(chr1), PHA2-B (chr17), PHA2-C (chr12). L'analyse de 5 à 7 marqueurs microsatellites de chaque région nous a permis de les exclure de même que la région du gène SLC12A3 (Na-Cl cotransport). Nous avons ainsi montré que l'HHF faisait intervenir au moins un quatrième locus.

#### 4. Génétique d'autres maladies cardiovasculaires

**La dysplasie fibromusculaire (DFM)** est une artériopathie systémique d'origine inconnue, à prédominance féminine, touchant les artères musculaires de moyen calibre en particulier les atteintes rénales et cérébrales. Nous avons effectué depuis 1995-6 un effort systématique d'évaluation familiale de la DFM à partir de plus de 100 patients atteints de DFM et avons identifié environ 10 % de cas familiaux. Des premières études moléculaires n'ont pas permis de mettre en évidence une relation avec certains gènes de la matrice vasculaire (COL3A1, Elastine). Nous poursuivons l'analyse de cette pathologie avec en particulier la recherche d'une amélioration de la caractérisation phénotypique de l'atteinte vasculaire — des résultats prometteurs ont été obtenus par échographie de haute résolution en collaboration avec l'unité 337 (S. Laurent, P. Boutouyrie ; Projet financé par la Société Française d'Hypertension Artérielle).

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). L'étude des fibroblastes de patients atteints a montré l'absence d'anomalie dans la sécrétion du collagène mais en ultrastructure des ruptures des fibres élastiques et des fibres de collagène. Une analyse de génétique moléculaire a permis d'éliminer les principaux gènes candidats de la matrice extracellulaire. Un tour du génome devrait permettre de localiser le gène responsable de la maladie (collaboration avec le Centre National de Génotypage).

#### BIBLIOGRAPHIE

2000

GIACCHE M., VUAGNAT A., HUNT S.C., HOPKINS P.N., FISHER N.D.L., AZIZI M., CORVOL P., WILLIAMS G.H. and JEUNEMAITRE X. Aldosterone stimulation by angiotensin II : influence of gender, plasma renin and familial resemblance. *Hypertension* 35 : 710-716, 2000.

HANON O., GIRERD X., LUONG V.U., JEUNEMAITRE X., LAURENT S. and SAFAR M. Association between the apolipoprotein E polymorphism and arteries wall thickness in asymptomatic adults. *J. Hypertens.* 18 : 431-436, 2000.

CELERIER J., SCHMID G., LE CAER J.-P., GIMENEZ-ROQUEPLO A.-P., BUR D., FRIEDLEIN A., LANGEN H., CORVOL P. and JEUNEMAITRE X. Characterization of a

human angiotensinogen cleaved in its reactive center loop by a proteolytic activity from Chinese Ovary cells. *J. Biol. Chem.* 275 : 10648-10654, 2000.

THIBONNIER M., GRAVES M.K., WAGNER M.S., CHATELAIN N., SOUBRIER F., CORVOL P., WILLARD H.F. and JEUNEMAITRE X. Study of human V<sub>1</sub>-vascular vasopressin receptor gene microsatellite polymorphisms in human essential hypertension. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 32 : 557-564, 2000.

GERMAIN S., HOWELL M., ESSLEMONT G.M. and HILL C.S. Homeodomain and winged-helix transcription factors recruit activated Smads to distinct promoter elements via a common Smad interaction motif. *Genes Dev.* 14 : 435-451, 2000.

GEORGIADIS D., VAZEUX G., LLORENS-CORTES C., YIOTAKIS A. and DIVE V. Potent and selective inhibition of zinc aminopeptidase A (EC 3.4.11.7, APA) by glutamyl aminophosphinic peptides : Importance of glutamyl aminophosphinic residue in the P1 position. *Biochemistry* 39 : 1152-1155, 2000.

ITURRIOZ X., VAZEUX G., CELERIER J., CORVOL P. and LLORENS-CORTES C. Histidine 450 is essential for catalytic activity and, with Ca<sup>2+</sup>, contribute to the substrate specificity of aminopeptidase A. *Biochemistry* 39 : 3061-3068, 2000.

PARNOT C., BARDIN S., MISEREY-LENKEI S., GUEDIN D., CORVOL P. & CLAUSER E. Systematic identification of mutations that constitutively activate the angiotensin II AT<sub>1A</sub> receptor by screening a randomly mutated cDNA library with an original pharmacological bioassay. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000, 97 : 7615-20.

MULLER L., VALDENAIRE O., BARRET A., KORTH P., PINET F., CORVOL P. and TOUGARD C. Expression of the endothelin-converting enzyme isoforms in endothelial cells. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 36 (Suppl. 1) : S15-S18, 2000.

VILA-PORCILE E., BARRET A. and CORVOL P. Secretion of renin-angiotensin system (RAS) components by normal and tumoral lactotropes : a comparative study using reverse hemolytic plaque assay (RHPA) and immunoelectron microscopy. *J. Histochem. Cytochem.* 48 (12) : 1691-1704, 2000.

EGIDY G., JUILLERAT-JEANNERET L., KORTH P., BOSMAN F.T. and PINET F. The endothelin system in human normal colon. Potential roles in gastrointestinal physiology. *Am. J. Physiol.* 279 : G211-G222, 2000.

EGIDY G., JUILLERAT-JEANNERET L., JEANNIN J.-F., KORTH P., BOSMAN F.T. and PINET F. Modulation of human colon tumor-stromal interactions by the endothelin system. *Am. J. Pathol.* 157 : 1863-1874, 2000.

PEDUTOEBERL L., EGIDY G., PINET F. and JUILLERAT-JEANNERET L. Endothelin receptor blockade potentiates FasL-induced apoptosis in colon carcinoma cells via protein kinase C-pathway. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 36 (5 Suppl. 1) : S354-S356, 2000.

EGIDY G., PEDUTOEBERL L., VALDENAIRE O., IRMLER M., MAJDI K., DISERENS A.C., FONTANA A., JANZER R.C., PINET F. and JUILLERAT-JEANNERET L. The endothelin system in human glioblastoma. *Lab. Invest.* 80 : 1681-1689, 2000.

JULLERAT-JEANNERET L., LOHM S., HAMOU M.F. and PINET F. Regulation of aminopeptidase A in human brain tumor vasculature : evidence for a role of transforming growth factor  $\beta$ . *Lab. Invest.* 80 (6) : 973-980, 2000.

WARREN K.S., WU J.C., PINET F. and FISHMAN M.C. The genetic basis of cardiac function : dissection by zebrafish (*Danio rerio*) screens. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 355 : 939-944, 2000.

MULLER L., VALDENAIRE O., BARRET A., KORTH P., PINET F., CORVOL P. and TOUGARD C. Expression of the endothelin-converting enzyme ECE-1 isoforms in endothelial cells. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 36 (5 Suppl. 1) : S15-S18, 2000.

GERMAIN S., HOWELL M., ESSLEMONT G.M. and HILL C.S. Homeodomain and winged-helix transcription factors recruit activated Smads to distinct promoter elements via a common Smad interaction motif. *Genes Dev.* 14 : 435-451, 2000.

JAFARIAN-TEHRANI M., LSTWAK S., BARRIENTOS R.M., MICHAUD A., CORVOL P. and STERNBERG E.M. Exclusion of angiotensin I-converting enzyme as a candidate gene involved to exudative inflammatory resistance in F344/N rats. *Mol. Med.* 6 : 319-331, 2000.

LENKEI Z., BEAUDET A., CHARTREL N., DE MOTA N., IRINOPOULOS T., BRAUN B., VAUDRY H. and LLORENS-CORTES C. A highly sensitive quantitative cytosensor technique for the identification of receptor ligands in tissue extracts. *J. Histochem. Cytochem.* 48 : 1553-1563, 2000.

DE MOTA N., LENKEI Z. and LLORENS-CORTES C. Cloning, pharmacological characterization and brain distribution of the rat apelin receptor. *Neuroendocrinology* 72 : 400-407, 2000.

CORVOL P. L'homme et son environnement, ou de la complexité dans le domaine de la santé. *Méd. Sci.* 16 : 1015-1016, 2000.

DUFOUR C., CASANE D., DENTEN D., WICKINGS J., CORVOL P. and JEUNEMAITRE X. Human-chimpanzee DNA sequence variation in the four major genes of the renin angiotensin system. *Genomics* 69 : 14-26, 2000.

REAUX A., ITURRIOZ X., VAZEUX G., FOURNIE-ZALUSKI M.-C., DAVID C., ROQUES B.-P., CORVOL P. and LLORENS-CORTES C. Aminopeptidase A, which generates one of the main effector peptides of the brain renin-angiotensin system, angiotensin III, has a key role in central control of arterial blood pressure. *Biochem. Soc. Trans.* 28 : 435-440, 2000.

CLAUSER E. Synthèse et actions locales et à distance des peptides vasoactifs. *Ann. Endocrinol.* 61 : 10-15, 2000.

DISSE-NICODEME S., ACHARD J.-M., DESITTER I., HOUOT A.-M., FOURNIER A., CORVOL P. and JEUNEMAITRE X. A new locus on chromosome 12p13.3 for pseudo-hypoaldosteronism type II, an autosomal dominant form of hypertension. *Am. J. Hum. Genet.* 67 : 302-310, 2000.

AZIZI M., MASSIEN C., MICHAUD A. and CORVOL P. In vitro and in vivo inhibition of the 2 active sites of ACE of omapatrilat, a vasopeptidase inhibitor. *Hypertension* 35 : 1226-1231, 2000.

MULLER L., CAMERON A., FORTENBERRY Y., APLETALINA E.V. and LINDBERG I. Processing and sorting of the prohormone convertase 2 propeptide. *J. Biol. Chem.* 275 : 39213-39222, 2000.

APLETALINA E.V., MULLER L. and LINDBERG I. Mutations in the catalytic domain of prohormone convertase 2 result in decreased binding to 7B2 and loss of inhibition with 7B2 C-terminal peptide. *J. Biol. Chem.* 275 : 14667-14677, 2000.

WILLIAMS G.H., FISHER N.D., HUNT S.C., JEUNEMAITRE X., HOPKINS P.N. and HOLLENBERG N.K. Effects of gender and genotype on the phenotypic expression of nonmodulating essential hypertension. *Kidney Int.* 57 : 1404-1407, 2000.

SHARMA A.M. and JEUNEMAITRE X. The future of genetic association studies in hypertension : improving the signal to noise ratio. *J. Hypertens* 18 : 811-814, 2000.

AZIZI M., HALLOUIN M.C., JEUNEMAITRE X., GUYENE T.T., MENARD J. Influence of the M235T polymorphism of human angiotensinogen (AGT) on plasma AGT and renin concentrations after ethinylestradiol administration. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85 : 4331-4337, 2000.

## 2001

MISEREY-LENKEI S., LENKEI Z., PARNOT C., CORVOL P. & CLAUSER E. A functional tagged angiotensin II AT<sub>1A</sub> receptor recruits the endogenous Gq/11 protein to the membrane and induces its specific internalization independently of receptor G protein coupling in HEK-293 cell. *Mol. Endocrinol.* 2001, 15 : 294-307.

FUCHS S., AMIEL J., CLAUDEL S., LYONNET S., CORVOL P. and PINET F. Functional characterization of three mutations of the endothelin B receptor gene in patients with Hirschsprung's disease : evidence for selective loss of Gi coupling. *Mol. Medicine* 7 (2) : 115-124, 2001.

CRONIER L., BASTIDE B., DEFAMIE N., NIGER C., POINTIS G. and GASC J.-M., MALASSINE A. Involvement of gap junctional communication and connexin expression in trophoblast differentiation of the human placenta. *Histol Histopathol.* 16 : 285-95, 2001.

MENETON P., BLOCH-FAURE M., HAGEGE A.A., RUETTEN H., HUANG W., BERGAYA S., CEILER D., GEHRING D., MARTINS I., SALMON G., BOULANGER C.-M., NUSSBERGER J., CROZATIER B., GASC J.-M., HEUDES D., BRUNEVALL P., DOETSCHMAN T., MENARD J. and ALHENC-GELAS F. Cardiovascular abnormalities with normal blood pressure in tissue kallikrein-deficient mice *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98 : 2634-2639, 2001.



RAJI A., WILLIAMS G.H., JEUNEMAITRE X., HOPKINS P.N., HUNT S.C., HOLLENBERG N.K. and SEELY E.W. Insulin resistance in hypertensives : effects of salt sensitivity, renin status and sodium intake. *J. Hypertens.* 19 : 99-105, 2001.

HURWITZ S., POTTER B., WEISS R.J., JEUNEMAITRE X., HOPKINS P.N., HUNT S.C., LITCHFIELD W.R. and WILLIAMS G.H. Influence of sodium intake on the reliability of active renin as a measure of the renin-angiotensin system in essential hypertension. *Am. J. Clin. Pathol.* 115 : 304-312, 2001.

VUAGNAT A., GIACCHE M., HOPKINS P.N., HUNT S.C., AZIZI M., FISHER N.D.L., WILLIAMS G.H., CORVOL P. and JEUNEMAITRE X. Plasma LDL cholesterol is a strong predictor of the blood pressure increase following an acute infusion of angiotensin II. *J. Mol. Med.* 79 : 175-183, 2001.

REAUX A., FOURNIE-ZALUSKI M.-C., LLORENS-CORTES C. Angiotensin III : a central regulator of vasopressin release and blood pressure. *TRENDS in Endocrinology & Metabolism*, 12 (4) : 157-162, 2001.

REAUX A., DE MOTA N., SKULTETYOVA I., LENKEI Z., EL MESSARI S., GALLATZ K., CORVOL P., PALKOVITS M., LLORENS-CORTES C. Physiological role of a novel neuropeptide, apelin, and its receptor in the rat brain *J. Neurochem.* 77 : 1-13, 2001.

#### BREVETS

Brevet déposé sur : Effets anti-angiogénique de l'angiotensinogène et de ses molécules apparentées — Avril 2001 — P. CORVOL, J. CÉLÉRIER, J.-M. GASC, N. LAMANDÉ.

#### EXPOSÉS, CONGRÈS

**Monsieur Pierre Corvol** a participé aux congrès et réunions suivants : Gordon Research Conference (Angiotensin, Ventura, 11-15 mars 2001) (conférencier invité) ; Alfediam, Montpellier, 28 mars 2001 (conférence plénière) ; Symposium « Vascular Biology », Warwick (UK), 18 avril 2001 ; Meeting de la Société Belge de Biologie Cellulaire (Liège), 21 avril (conférence plénière) ; Colloque National du Réseau Français d'Angiogenèse (27-28 avril 2001 — Collège de France, Paris) ; Colloque sur la Recherche Médicale 2001, Montpellier, 4 mai 2001 ; Séminaire sur Angiogenèse, IGR (Villejuif) 10 mai 2001 ; Société Européenne d'Endocrinologie, Turin, 10 juin 2001 (conférence plénière) ; Séminaire INSERM U495, Paris, 18 juin 2001.

**Monsieur Xavier Houard a participé aux congrès suivants** : Colloque National sur la Protéolyse Cellulaire, Société Française de Biochimie et de Biologie Moléculaire, 5-6 avril 2000, Arcachon, (communication orale) ; Congrès du Groupe de Réflexion sur la Recherche Cardio-vasculaire, 18-19 avril 2000, Saint-

Malo, (communication affichée) ; Congrès de l'European Council for Blood Pressure and Cardiovascular Research, octobre 2000, Noordwijkerhout (Pays-Bas), (communication affichée) ; Gordon Research Conférence sur l'angiotensine organisée à Ventura (Californie) en mars 2001 (communication affichée) ; Congrès du Groupe de Réflexion sur la Recherche Cardio-vasculaire, avril 2001, Montpellier, (communication affichée primée).

**Judith Favier : Séminaires et cours sur invitation :** « *Facteurs de transcription de l'angiogenèse* » aux X<sup>es</sup> Journées Européennes de la Société Française de Cardiologie (Paris, janvier 2001) ; « *Angiogenèse Physiologique* » au V<sup>e</sup> Séminaire annuel de Formation en Pharmacologie Expérimentale et Clinique : « Pharmacologie et Cancérologie : Angiogenèse et Apoptose », (Vaux de Cernay, décembre 2000) ; Cours sur « *l'Angiogenèse normale et pathologique* » à la Maîtrise des Sciences Biologiques et Médicales de Pharmacologie Cellulaire, Pharmacogénétique et pharmacocinétique, Faculté de Médecine Lariboisière-Saint-Louis.

**Amauri Cruz, Katia Savary et Jean-Marie Gasc** ont participé à la Sixième réunion du Réseau Français d'Angiogenèse (Paris, avril 2001).

**Amauri Cruz, Judith Favier et Jérôme Célièrier** ont participé à l'Euroconférence sur l'Angiogenèse (Paris, mars 2001).

**Stéphane Germain** a participé au congrès et séminaires suivants : Criblage de gènes induits dans les cellules endothéliales humaines. Congrès cœur, vaisseaux et athérosclérose (Montpellier, 2001) ; Angiogenèse et pathologie : caractérisation de nouveaux gènes (marqueurs diagnostiques et/ou cibles thérapeutiques). 6<sup>e</sup> Colloque National d'Angiogenèse (Paris, 2001) ; Variations in global gene expression in different hypoxic/angiogenic states. 8<sup>e</sup> Rencontre du DBMS et de l'IBS : Aspects Cellulaires et Moléculaires de l'Angiogenèse. Autrans, France, 2001 (Poster) ; Transcriptional control by the TGF-b/Smad signaling system. 5th Annual Meeting of the European Council for Blood Pressure and Cardiovascular Research (ECCR), Noordwijkerhout, Hollande, 2000 ; Criblage de nouveaux gènes induits par l'hypoxie dans les cellules endothéliales humaines. INSERM U127 — Hôpital Lariboisière — (2001) ; Régulation de l'expression des gènes cibles du TGF-b par les protéines Smads — INSERM U489 — Hôpital Tenon — (2000) ; Homeodomain and winged-helix transcription factors recruit activated Smads to distinct promoter elements via a common Smad interaction motif. INSERM U460 — Hôpital Bichat — (2000) ; Transcriptional control by the TGF-b/Smad signaling system. INSERM U525 — Hôpital Saint-Louis — (2000).

**Mademoiselle Florence Pinet et son équipe** ont participé aux congrès suivants : Congrès Biologie et pathologie du cœur et des Vaisseaux — Saint-Malo (18-19 avril 2000) ; European Research Conference on Blood Pressure and Cardiovascular Disease — Noordwijkerhout, Hollande (13-15 octobre 2000) ; Gordon

Conference on angiotensin — Ventura USA (mars 2001) ; Congrès Cœurs, Vaisseaux, Athérosclérose — Montpellier (26-27 avril 2001).

**Monsieur Éric Clauser** a participé aux congrès suivants : Angiotensin II receptors ; activation, dimerization and internalization. Department of Pathology — Emory University — Atlanta GA — USA (july 2000). Angiotensin II receptors : activation, dimerization and internalization. Department of Physiology D Case Western Reserve University D Cleveland OH USA.

**Madame Claude Tougard** a participé aux congrès suivants : 1<sup>er</sup> Symposium Confoquals Leica. Paris, 7 mars 2001.

**Madame Catherine Llorens-Cortes** et son équipe ont participé aux congrès suivants : Structure-function relationships of aminopeptidase A. Biochemical Society meeting 671 — University of Leeds (United Kingdom) — 11-13 avril 2000 ; Rôles respectifs de l'Angiotensine II et de l'Angiotensine III dans le contrôle central de la pression artérielle. 8<sup>e</sup> Colloque de l'École Doctorale Neurosciences : « Cerveau-Cognition-Comportement » — Roscoff (France) — 17-19 septembre 2000 ; Rôles respectifs de l'angiotensine II et de l'angiotensine III dans le contrôle central de la pression artérielle. XXIX<sup>e</sup> Colloque de la Société de Neuroendocrinologie — Futuroscope Poitiers (France) — 12-14 septembre 2000 ; Étude structure-fonction du site actif de l'aminopeptidase A, une enzyme impliquée in vivo dans le contrôle de la pression artérielle. XXIX<sup>e</sup> Colloque de la Société de Neuroendocrinologie — Futuroscope Poitiers (France) — 12-14 septembre 2000 ; Mise en évidence des sites de liaison nucléaires de la neurotensine dans les cellules CHO exprimant le récepteur de la neurotensine. XXIX<sup>e</sup> Colloque de la Société de Neuroendocrinologie — Futuroscope Poitiers (France) — 12-14 septembre 2000 ; Role of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) in Ang II-induced intracellular calcium mobilization and metabolic CO<sub>2</sub> production in the rat cortical thick ascending limb. Toronto, 33<sup>rd</sup> Annual Meeting of American Society of Nephrology, 13-16 octobre 2000 ; UK Biochemical Society Meeting 671 University of Leeds UK — 11-13 avril 2000 — Aminopeptidase A and a novel brain angiotensin system mediating cardiovascular control (conférencier) ; International Conference on Cell Surface Aminopeptidases. Nagoya, Japon, 15-18 août 2000. Importance of aminopeptidase A in the central control of blood pressure (Conférencier et Président de séance) ; 8<sup>e</sup> Colloque de l'école doctorale Neurobiologique et Comportement — Centre de conférence du CNRS — Roscoff, France, 18-19 septembre 2000 (Participant) ; Invitation par l'Académie des Sciences de France et l'Académie des Sciences de la Société Royale du Canada au Colloque sur les nouvelles thérapies et le génome — Montréal, Canada, 26-29 novembre 2000. Importance of aminopeptidase A in the central control of blood pressure (Conférencier) ; Colloque organisé par la Chaire de Médecine Expérimentale, Collège de France, intitulé « Récepteurs Couplés aux Protéines G : structure et interaction avec leurs partenaires » ; Paris, France, 3 avril 2001. Récepteurs orphelins : de la découverte du ligand au rôle physiologique. Application à l'apéline.

**Monsieur Xavier Jeunemaitre** et son équipe ont participé aux congrès suivants :

**Congrès :** III<sup>e</sup> Reunion Internationale sur le canal Na épithélial, ENaC 2000, Lausanne, septembre 2000 ; 18<sup>th</sup> Scientific Meeting of the International Society of Hypertension (ISH), Chicago, USA, 20-24 août 2000 ; XX<sup>e</sup> Journées de l'Hypertension Artérielle, 14-15 décembre 2000 ; European Council for blood pressure and Cardiovascular Research (ECCR), Noordwikerhout, The Netherlands, 25-28 octobre 2000.

**Conférences invitées :** « The Renin angiotensin system genetic paradigm : blood pressure and beyond » in the satellite symposium « Genetics of Hypertension : Approaches, paradigms and impact » Porto Cervo, Sardinia, Italy, september 30-october 1, 2000 ; « Genetics of Human Essential Hypertension » and « Genetics of the renin angiotensin system » in European School of Genetic Medicine, 1<sup>st</sup> Course in Genetics and Renal Diseases, Sestri-Levante, Italy, november 15-18, 2000 ; « Strategies of identification of polygenic cardiovascular diseases » in 24 Annual Scientific Meeting of the German Hypertension Society, Hypertonie 2000, Heidelberg, nov. 22-25 2001 ; « Génétique de l'Hypertension Artérielle » Journées scientifiques annuelles de la Société Française de Génétique Humaine, Paris les 28 et 29 novembre 2001 ; « Molecular basis of Hypertension », IV International Symposium and Integrated Course on Molecular Medicine and Polish Congress of Arterial Hypertension, Warsaw, 30 nov.-1 dec. 2000 ; « Tests génétiques et hypertension artérielle » Colloque d'animation de la recherche organisée par le Comité d'Interface INSERM-GÉNÉTIQUE, intitulé « Du bon usage des diagnostics génétiques ». Paris, les 26 et 27 janvier 2001 ; « Hypertensions familiales avec hypo ou hyperkaliémie », Séminaires Pierre Royer, Institut Curie, 19-20 mars 2001 ; « Genetics of arterial hypertension » XXII<sup>e</sup> Congress of the Portuguese Society of Cardiology, Villamoura, 10-13 april 2001 ; « Syndrome de Gordon » Actualités Néphrologiques Jean Hamburger Hôpital Necker, 7-8 mai 2001.

#### ENSEIGNEMENTS

**Monsieur Pierre Corvol** a participé aux enseignements suivants : DEA d'Endocrinologie Moléculaire (Paris XI) ; DEA de Pharmacologie (Paris XI).

**Monsieur Maurice Pagano** a participé aux enseignements suivants : Enseignements de Biochimie et Biologie Moléculaire UFR Médicale Broussais-Hôtel-Dieu, Université Paris 6 ; PCEM1 : cours de Biochimie métabolique et enseignements dirigés de Biochimie et Biologie Moléculaire ; PCEM2 : enseignements dirigés de Biochimie et Biologie Moléculaire ; Enseignements de Biochimie, UFR des Sciences de la Vie, Université Paris 6 ; Enseignements dirigés de Biochimie Métabolique, DEUG SCV2 ; Enseignements dirigés sur les protéines, module de Biochimie Structurale et Métabolique de la Licence de Biologie Cellu-

laire et de Physiologie ; Enseignements dirigés sur les protéines et l'enzymologie, certificat C2 de la Maîtrise de Biochimie.

**Mademoiselle Florence Pinet** est co-directeur des études du DEA de Biologie et Pharmacologie de l'Hémostase et des Vaisseaux et a participé à son enseignement. Elle fait partie du conseil d'administration du Groupe de Réflexion sur la Recherche Cardio-vasculaire : GRRC.

**Madame Claude Tougard** a participé aux enseignements suivants : DEA de Biologie Cellulaire et Moléculaire, Paris VI, mars 2001. Cours dans le cadre du Certificat de Maîtrise de Biologie Moléculaire de la Cellule, Paris XI, avril 2001.

**Monsieur Laurent Muller** a participé à l'enseignement du DEA d'Endocrinologie et Interactions Cellulaires, Paris XI, mai 2001.

**Madame Catherine Llorens-Cortes** a participé à l'enseignement de : 3<sup>e</sup> cycle C2 de Maîtrise et Diplôme d'Université « Pharmacologie Endocrinienne », Paris VII ; 3<sup>e</sup> cycle DEA de Pharmacochimie Moléculaire, Université René Descartes Paris V ; Participation au Jury de DEA de Neurosciences Paris VI, Paris XI ; Participation au Jury de DEA de Pharmacochimie Moléculaire Paris V.

**Monsieur Éric Clauser** a participé aux enseignements suivants : Cours de Biochimie de 1<sup>re</sup> (Biologie Moléculaire) et 2<sup>e</sup> année (Récepteurs membranaires, signalisation et communication cellulaire) — Faculté de Médecine St Antoine ; DEA d'endocrinologie moléculaire (Pr Mantel) ; DEA de Différenciation cellulaire et fonctions intégrées (Pr Chambaz) ; Certificats de Maîtrise (MSBM) de Biotechnologies (Paris VI) et Pharmacologie Endocrinienne (Paris VII) ; Coordinateur d'un projet d'école doctorale Paris VI-Paris VII associant 5 DEAs sur le thème « Physiologie et Physiopathologie ; Membre élu et vice-président de la CSS5 et membre de l'IC2 de l'INSERM.

**Madame Catherine Monnot** a participé à l'enseignement suivant : Cours de Pharmacologie et Toxicologie Moléculaires. Bases moléculaires de la pharmacologie (formation permanente) — Centre Scientifique d'Orsay (Université Paris-Sud XI).

**Monsieur Xavier Jeunemaitre** 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) ; Participation à la 12<sup>e</sup> rencontre annuelle du réseau Européen Inserm Jeunes, sur le thème « Objectif santé : voyage dans les

biothérapies » Angers 29 oct.-2 nov. 2000 ; Organisation et participation de 2 Journées de Formation sur le thème « Actualités sur la Génétique » les 24-25 avril 2001 dans le cadre des Journées de Formation Continue de l'AP-HP, Paris.

#### LISTE DES DIPLOMÉS

##### DEAs

**Katia Savary** : DEA d'Endocrinologie et Interactions Cellulaires (A. Mantel — Paris XI).

*Rôle de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE) au cours du développement embryonnaire précoce.*

**Sébastien Le Jan** : DEA de Physiopathologie Cellulaire et Moléculaire (M. Andreani — Paris VI).

*Identification et caractérisation de nouveaux gènes impliqués dans les processus d'hypoxie / angiogénèse.*

**Raphael Rozenfeld** : DEA de Pharmacochimie Moléculaire — Pharmacologie Expérimentale et Métabolisme (C. Garbay — Paris V).

*Exploration du site actif de l'aminopeptidase A par mutagenèse dirigée et expression dans les cellules eucaryotes.*

**Sandrine Billet** : DEA de Différenciation Cellulaire et Fonctions Intégrées (J. Chambaz — Paris VI).

*Interactions fonctionnelles entre récepteurs AT<sub>1</sub>.*

##### THÈSES

**Annabelle Reaux** : Thèse de Doctorat d'Université, Spécialité : Neurosciences (Paris XII).

*Rôle de l'aminopeptidase A dans la production de l'angiotensine III cérébrale : utilisation des inhibiteurs de cette enzyme comme antihypertenseurs potentiels à action centrale.*

*Rôle physiologique d'un nouveau neuropeptide, l'apéline, dans le cerveau de rat.*  
Date de la soutenance : 11 juin 2001.

**Xavier Iturrioz** : Thèse de Doctorat d'Université, Spécialité : Biologie moléculaire et cellulaire (Paris VI).

*Caractérisation fonctionnelle du site actif de l'aminopeptidase A par mutagenèse dirigée ; Mise en évidence des nouveaux motifs consensus des aminopeptidases monozyms.*

Date de la soutenance : 25 juin 2001.