

## Médecine expérimentale

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

### ENSEIGNEMENT

Pas de cours cette année.

### RAPPORT D'ACTIVITÉ DU LABORATOIRE

#### Contrôle moléculaire du développement vasculaire

*Équipe* : Anne Eichmann, DR1 Inserm, Luc Pardanaud, CR1 CNRS, Laurence Pibouin, IR Inserm, Christiane Bréant, IE1 CNRS

*Chercheurs post-doctorants* : Raquel del Toro, espagnole, Isabelle Brunet, française, Maria Machado, portugaise, Brunella Christofaro, italienne

*Étudiants* : Thomas Mathivet, thèse, 3<sup>e</sup> année.

#### *Contrôle moléculaire du guidage des capillaires : sélection des « tip cells »*

L'angiogenèse par bourgeonnement dépend de cellules endothéliales (CE) spécialisées, appelés « *tip cells* », qui sont situées à l'extrémité des capillaires. Ces *tip cells* expriment des taux importants de Delta-like 4 (Dll4), un ligand de Notch. DLL4 régule négativement la réponse des CE au VEGF et agit comme un frein de cette signalisation, contrôlant ainsi la formation d'un nombre limité de *tip cells* (Suchting *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2007 ; Tammela *et al.*, *Nature*, 2008).

Puisque la quasi-totalité des CE dans les rétines des souris mutées pour DLL4 possèdent des caractéristiques morphologiques et génétiques des *tip cells*, nous avons pu isoler ces cellules en grand nombre et déterminer ainsi le transcriptome des *tip cells*. L'analyse des gènes sur-exprimés dans les CE de souris *dll4*<sup>+/-</sup> a permis d'identifier de nouveaux marqueurs de *tip cells* [9]. Les *tip cells* expriment des molécules comme UPAR permettant de dégrader la matrice extracellulaire, facilitant ainsi leur migration. Les *tip cells* produisent aussi la lame basale du

capillaire [12]. Enfin, les *tip cells* produisent de nombreuses molécules qui sont secrétées, leur permettant de communiquer avec leur environnement. Parmi ces molécules, l'angiopoïétine 2, l'ESM-1 et l'apeline se lient à des récepteurs exprimés par les cellules situées juste en arrière des *tip cells* et qui forment la lumière du capillaire. L'analyse de mutants murins déficients pour les gènes codant pour l'apeline ou son récepteur APJ a permis de montrer que ce système ligand/récepteur régule la prolifération capillaire. L'analyse du transcriptome des *tip cells* a ainsi permis de dévoiler les propriétés moléculaires nécessaires au guidage et à la croissance des capillaires.

#### *Facteurs de guidage des axones dans le système vasculaire*

Le bourgeonnement des capillaires montre des similarités anatomiques et moléculaires avec le guidage axonal. À la recherche de nouveaux récepteurs de guidage axonal qui pourraient être exprimés par le système vasculaire, nous avons identifié le récepteur de la Nétrine-1, UNC5B (Lu *et al.*, *Nature*, 2004 ; Larrivée *et al.*, *Genes & Dev*, 1997). Nous avons démontré chez l'embryon de souris et de poisson-zèbre que la perte de fonction du récepteur UNC5B de la Nétrine-1 provoque l'extension accrue des filopodes des cônes de croissance endothéliaux et un branchement excessif du réseau vasculaire (Lu *et al.*, 2004). Cependant, les souris Netrin-1 déficientes ne montrent pas de défaut vasculaire, ce qui suggère qu'UNC5B doit avoir un autre ligand. En collaboration avec la société Genentech, nous avons identifié un partenaire de liaison à haute affinité pour UNC5B, Robo4. Robo4 est aussi un récepteur transmembranaire, dont on avait précédemment décrit une liaison à la molécule de guidage Slit-2. Nos travaux montrent que Robo4 agit comme ligand d'UNC5B [1]. L'activation d'UNC5B par Robo4 inhibe la signalisation en aval du VEGFR2, freinant ainsi l'angiogenèse et jouant un rôle de stabilisateur des vaisseaux. Ces résultats soulignent que les récepteurs du guidage des axones régulent l'activité des récepteurs du VEGF dans le système vasculaire. En effet, comme UNC5B et les neuropilines, les éphrines régulent l'angiogenèse par une coopération fonctionnelle avec les VEGFR [10, 11].

#### *Facteurs de croissance vasculaire dans le système nerveux*

Comme les récepteurs de guidage axonal qui régulent l'angiogenèse, les facteurs de croissance vasculaire jouent un rôle dans le développement neural. En collaboration avec l'équipe de J.-L. Thomas, Inserm U 975, nous avons montré que le VEGF-C joue un rôle dans le développement des cellules souches neurales du cerveau par la liaison à son récepteur VEGFR-3, qui est exprimé dans les cellules souches neurales [2]. Nous avons étudié la présence et la fonction critique du VEGFR-3 dans les astrocytes de la niche de neurogénèse sous-ventriculaire, où s'exprime également le ligand VEGF-C. L'activité du VEGFR-3 contribue au maintien de la cohésion tissulaire de la niche et sa stimulation par le VEGF-C active la division des cellules souches neurales. Nous proposons que la signalisation VEGF-C/VEGFR-3 entretienne la neurogénèse olfactive postnatale. Cette action s'opère entre cellules neurales, sans intermédiaire vasculaire puisque VEGFR-3 n'est pas exprimé par les endothéliales de la niche et que le VEGF-C, à la différence du VEGF-A, ne paraît pas avoir d'effet angiogénique dans le parenchyme cérébral.

## Hypoxie, angiogenèse : protéines matricielles en pathologie cardiovasculaire et tumorale

*Équipe* : S. Germain, CR1 Inserm, C. Monnot, CR1 Inserm, L. Muller, CR1 Inserm, A. Galaup, CDD Jeune chercheur Inserm, A. Barret, IR CNRS, M. Durand, CDD IE Inserm, J. Philippe, T CNRS, C. Ardidie-Robouant, AT CdF, M. Lesage, AT CdF

*Post-doctorants* : A. Cazes, APHP, J. Verine, APHP, N. Sabaa-Mettoudi, CDD Inserm, C. Bouletti, APHP

*Étudiants* : S. Gauvrit, 4<sup>e</sup> année de thèse, C. Pichol-Thievend, 2<sup>e</sup> année de thèse, N. Beckouche, 2<sup>e</sup> année de thèse, G. Briois, 1<sup>re</sup> année de thèse, O. Benoît, M2, Virginie Lelarge, M2.

L'étude des mécanismes moléculaires impliqués dans l'hypoxie cellulaire ainsi que dans l'angiogenèse réactionnelle au cours des pathologies ischémiques et tumorales représente un enjeu médical et thérapeutique important et constitue notre thème de recherche principal. L'hypoxie, ou baisse de pression partielle en oxygène, est en effet une caractéristique des pathologies cardiovasculaires ischémiques et tumorales. Lorsque le microenvironnement devient hypoxique, il se développe une reprogrammation de l'expression de nombreux gènes codants pour des protéines impliqués dans la régulation de l'intégrité vasculaire et la reperfusion des tissus dont *angptl4* qui code pour une protéine sécrétée de 406 acides aminés, ANGPTL4, qui ne se lie pas au récepteur Tie2. Un consensus se dégage sur son rôle dans la régulation du métabolisme glucidique et lipidique par inhibition de la lipoprotéine lipase, *via* un mécanisme différent de celui d'ANGPTL3. Son effet sur la croissance des néovaisseaux semble dépendant du modèle étudié : proangiogénique dans la membrane chorioallantoïdienne de poulet (CAM) et anti-angiogénique dans le modèle de la cornée de rat par inhibition de la réponse induite par le VEGF.

Nous avons caractérisé les propriétés *in vitro* d'ANGPTL4 et montré que c'est une protéine sécrétée, présente sous deux formes distinctes : 1/ soluble dans le milieu de culture où elle est soumise à une protéolyse extracellulaire ; 2/ matricielle, associée à la matrice extracellulaire (MEC) subendothéliale et non protéolysée. ANGPTL4 matricielle interagit avec la MEC, *via* les héparanes sulfates protéoglycans, et inhibe l'adhésion et la migration des cellules endothéliales (CEs). Ce processus s'accompagne d'une diminution des fibres de stress et des points focaux d'adhésion. Nous avons mis au point un procédé de purification de l'ANGPTL4 entière et de ses domaines *coiled-coil* Nt et fibrinogen-like Ct. Nous avons étudié le rôle de ces différents domaines, montrant que l'interaction avec la MEC fait intervenir le domaine *coiled-coil* et que les propriétés de régulation de l'angiogenèse d'ANGPTL4 dépendent de ce domaine. Ces résultats montrent qu'ANGPTL4 est, d'une part, un marqueur des pathologies tumorales et, d'autre part, un acteur de la modulation de l'angiogenèse et de la perméabilité vasculaire.

L'ensemble des projets que nous développons actuellement consiste à caractériser le rôle d'ANGPTL4 : 1) *in vitro* sur les cellules endothéliales ; 2) dans des modèles précliniques *in vivo*, en utilisant les souris dont le gène *angptl4* est invalidé ; et 3) à mettre au point des outils propres, brevetables, de production et de mesure de la protéine ANGPTL4 chez l'homme. En effet, au cours du traitement d'un infarctus du myocarde, la reprise de la circulation sanguine dans les vaisseaux coronaires est parfois compromise en raison de lésions au niveau de la paroi de ces vaisseaux.

D'où l'importance de la découverte d'une protéine qui permettrait de limiter ce risque. Lors du traitement de l'infarctus du myocarde, l'urgence est de limiter la mort du tissu cardiaque et de revasculariser les vaisseaux coronaires occlus. Cependant, dans certains cas, la perfusion du cœur par le sang ne peut être rétablie, alors que la lumière des vaisseaux coronaires a pourtant été libérée du caillot qui les obstruait ; on parle alors du phénomène de *no-reflow*. Ce phénomène paradoxal est lié à une altération de la paroi vasculaire, laissant passer à l'extérieur le sérum et les protéines, aboutissant à la formation d'un œdème périvasculaire. Cette complication est de mauvais pronostic car elle compromet la revascularisation rapide du cœur et favorise l'extension des lésions. ANGPTL4 est produite en grande quantité au cours de l'infarctus et a un effet protecteur sur la microcirculation coronaire. Nous avons montré que l'injection de cette protéine, au cours de l'infarctus, protège les vaisseaux cardiaques et diminue la taille de l'infarctus (Galaup, 2011, en révision). Ces recherches ont donné lieu au dépôt d'un brevet. Les études précliniques se poursuivent afin de déterminer les doses thérapeutiques efficaces. En parallèle, une étude a été initiée chez l'homme afin de mesurer les taux circulants de cette protéine au cours de l'infarctus, pour rechercher une corrélation avec l'importance des lésions vasculaires et la taille de l'infarctus. En fonction des résultats de cette étude, un traitement destiné à augmenter la concentration sanguine de cette protéine pourrait être proposé chez l'homme afin de réduire les complications de l'infarctus.

La maturation vasculaire, le remodelage des jonctions endothéliales et le recrutement de cellules périvasculaires, sont des étapes cruciales pour l'établissement et le maintien des fonctions du vaisseau. Dans les rétinopathies prolifératives, l'angiogenèse induite par l'hypoxie est associée à des perturbations de la barrière vasculaire, un œdème et une perte de vision. Par conséquent, l'identification des facteurs qui régulent la maturation vasculaire est essentielle pour cibler l'angiogenèse pathologique. L'un des buts de nos études a été de caractériser l'angiogenèse, en nous concentrant sur la vascularisation rétinienne périnatale et pathologique chez des souris déficientes en *angptl4*. Nous avons montré chez ces souris que l'organisation des jonctions endothéliales et la couverture péricytes étaient altérées, qu'il existait une angiogenèse déficiente et une augmentation des fuites vasculaires, suggérant un retard de maturation. Dans le modèle de rétinopathie induite par l'oxygène, la néovascularisation pathologique qui résulte d'une hypoxie tissulaire a également été fortement inhibée chez les souris déficientes en *angptl4*. Cette étude montre donc que ANGPTL4 contrôle : 1) l'organisation des jonctions des CEs, 2) la couverture péricytaire, et 3) le contrôle de la perméabilité vasculaire et l'angiogenèse, à la fois pendant le développement et dans des conditions pathologiques (Gomez, 2011, en révision).

Enfin, nous avons aussi démontré en 2003 qu'ANGPTL4 était exprimé dans les carcinomes rénaux à cellules claires, qui représentent deux tiers des cancers du rein de l'adulte. Dans le cadre d'un PHRC mené en collaboration avec le service d'anatomie pathologique de l'hôpital Saint-Louis, nous avons analysé la valeur diagnostique et pronostique d'ANGPTL4 au niveau de l'ARN et de la protéine. La partie rétrospective de cette étude est effectuée et vient d'être publiée [13]. Sur une cohorte utilisant les tumorothèques annotées de plusieurs centres spécialisés, nous montrons que l'ARNm d'*angptl4* est un marqueur spécifique du cancer du rein à cellules claires, quel que soit son statut VHL. La sensibilité d'ANGPTL4 en tant que marqueur du ccRCC est de 100 % et sa spécificité est de 93,8 %. La valeur

prédictive positive est de 92,3 % et la valeur prédictive négative est de 100 %. De manière intéressante, ces fortes sensibilité et spécificité sont conservées en cas de métastases (respectivement 86,7 % et 100 %).

Cette analyse s'étend maintenant à l'étude de la protéine, dans le but d'un transfert vers la clinique. Le but est de rechercher une corrélation du taux circulant d'ANGPTL4 intratumoral avec la gravité ou le stade d'extension de la tumeur au moment de l'exérèse, ou avec l'évolution dans les deux à cinq ans suivant l'exérèse.

Parallèlement, une approche protéomique différentielle sans *a priori* a été réalisée par séparation des protéines en électrophorèse bidimensionnelle sur la MEC de cultures primaires de cellules endothéliales de micro- et macro-vaisseaux cultivées en normoxie ou hypoxie. Cette approche permet l'analyse de facteurs bioactifs associés aux composants structuraux de la MEC. Ainsi, nous avons identifié par spectrométrie de masse des protéases et des enzymes de pontage et de réticulation de la MEC. Certaines de ces protéines sont accumulées dans la MEC subendothéliale hypoxique, en association avec des réseaux de collagènes et de laminines. Les analyses de ces protéines de pontage de la MEC se poursuivent afin de déterminer leur rôle dans le remodelage matriciel et les réponses angiogéniques des cellules vasculaires (Bignon, 2011, en révision).

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

## Développement précoce et pathologies

*Équipe* : G. Nguyen, DR2 Inserm, F. Lebrin, CR1 Inserm, P. Corvol, Pr. Cdf, N. Lamandé, MCU CdF, A. Michaud, IE Inserm, S. Martin, IE Inserm, I. Queguiner, AI CdF,

*Post-doctorants* : T. Hirose, Japon

*Étudiants* : D. Bracquard, 3<sup>e</sup> année de thèse, S. Srun, 3<sup>e</sup> année de thèse, C. LeNaoures, M2, M. Ruggi, M1

Nos travaux portent sur 2 axes : 1) le récepteur de la prorénine (PRR) et son rôle dans les pathologies cardiovasculaires et rénales et dans la biologie des cellules souches, et 2) les mécanismes moléculaires impliqués dans la maladie de Rendu-Osler (MRO).

### *Fonctions du récepteur de la prorénine (PRR)*

#### PRR et pathologies cardiovasculaires et rénales

Le récepteur de la prorénine et de la rénine (PRR) est une molécule qui a été découverte en 2002. Il lie la prorénine et la rénine, favorise l'activation de la prorénine en rénine et stimule directement l'activité des MAP kinases en culture de cellules (Nguyen G. *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 109, 1417). PRR existe sous plusieurs formes moléculaires dont l'effet biologique reste à découvrir. Le rôle de PRR dépasse le strict cadre du système rénine-angiotensine et intéresse les phases précoces du développement [6-8].

Nous avons mis en évidence l'existence d'une forme soluble de PRR (sPRR) qui est retrouvée dans le plasma (Cousin C *et al.*, *Hypertension*, 53(6), 2009, 1077-82). Un test Elisa permettant de doser sPRR dans le sang et les urines est en cours de

validation préclinique dans le cadre d'une collaboration franco-allemande : le groupe de Dominik Muller (Max Delbruck Center, Berlin) produit la protéine recombinante, la compagnie de biotechnologie CellTrend (Luckenwalde, Allemagne) met au point le test Elisa et les échantillons sanguins de sujets sains volontaires sont collectés dans le Centre d'investigation clinique de l'hôpital européen Georges Pompidou à Paris dirigé par Michel Azizi. Les premiers résultats seront présentés au congrès High Blood Pressure Research en septembre 2011.

PRR joue un rôle essentiel au cours du développement embryonnaire. Nous avons montré que PRR est nécessaire au développement précoce et à la fonction rénale. En effet, le croisement des souris floxées pour le gène *PRR* avec des souris porteuses de la Cre-recombinase sous contrôle du promoteur nephrin spécifique des cellules épithéliales glomérulaires rénales provoque une insuffisance rénale sévère dès la naissance, ainsi que des anomalies profondes du développement rénal liées à une absence d'autophagie, et la mort des souris avant l'âge de 3 semaines (manuscrit sous presse [5]). Cette étude a été menée en collaboration avec les équipes de Dominik Muller et Michael Bader, le Max Delbruck Center et le Experimental and Clinical Research Center à Berlin (financement conjoint Inserm- ministère des Affaires étrangères et européennes / DFG et financement par le programme Hubert Curien « Procope »).

#### PRR et cellules souches

La seule mutation connue de PRR chez l'homme est responsable d'un retard mental lié à l'X (le gène de PRR est sur le chromosome X). Nous avons montré que PRR est fortement exprimé dans la zone des cellules souches corticales chez l'embryon de souris, et reste élevée au niveau du gyrus dentate, zone de prolifération des cellules souche neurales chez l'adulte. En collaboration avec le groupe de Matthias Groszer (U 839, Institut du Fer à Moulin, Paris) nous avons trouvé que l'inactivation de PRR dans les cellules souches corticales dorsales (excision de PRR par la Cre-recombinase sous contrôle du promoteur *Emx1*) inhibe leur renouvellement. Chez la souris mâle qui ne possède qu'un seul chromosome X, l'inactivation de PRR est responsable d'une absence totale de cortex dorsal tandis que chez la souris femelle hétérozygote, elle provoque une diminution du nombre des cellules souches et une différenciation prématurée des cellules souches en neurones (bourse postdoctorale, domaine d'intérêt majeur de la région Ile-de-France).

L'inactivation de PRR au niveau des cellules souches de la peau est obtenue en croisant les souris floxées PRR avec les souris porteuses d'une Cre-recombinase sous contrôle du promoteur K5 (keratin 5), modèle parfaitement caractérisé et largement utilisé. L'inactivation de PRR ciblée dans la peau provoque la mort *in utero* de l'embryon vers E 15.5. Elle est associée à des hémorragies et des anomalies de développement et de remodelage du réseau lymphatique. De même que pour le cortex, l'inactivation de PRR est responsable de l'absence d'auto-renouvellement des cellules souches de la peau et d'une maturation anormale des différentes couches cellulaires de l'épiderme.

Enfin, nous montrons que PRR est essentiel au développement précoce de l'embryon et qu'en son absence, obtenue par délétion de PRR avec une Cre-recombinase sous contrôle du promoteur PGK, l'embryon meurt au stade péri-implantatoire, vers E 6.5. Afin d'étudier les mécanismes sous contrôle de PRR au cours du développement, nous avons utilisé les cellules souches embryonnaires de souris (ESC). L'inhibition de l'expression de PRR dans les ESC inhibe leur auto-

renouvellement et provoque leur différenciation comme en témoigne la perte des marqueurs de pluripotente (Oct4, Sox2, Nanog, phosphatase alcaline). Finalement, ces résultats indiquent que PRR est essentiel à l'auto-renouvellement des cellules souches et au maintien de leur caractère indifférencié. Les mécanismes sous-jacents sont en cours d'étude.

### *Télangiectasie hémorragique héréditaire ou maladie de Rendu-Osler*

La télangiectasie hémorragique héréditaire (HHT) ou maladie de Rendu-Osler (MRO) est une maladie génétique rare (1/10 000) à transmission autosomique dominante. Elle est causée par des mutations sur les gènes *ENG* et *ACVLR1* qui codent respectivement pour endogline et *Activin-Like receptor Kinase 1*, deux récepteurs de la signalisation du *Transforming Growth factor- $\beta$*  exprimés au niveau de la cellule endothéliale. Les lésions vasculaires caractéristiques de l'HHT consistent en une dilatation de la lumière des vaisseaux sanguins et des défauts de recouvrement des CE par les cellules murales (cellules musculaires lisses vasculaires et péricytes). La manifestation la plus commune est un saignement du nez (épistaxis) spontané et répété souvent associé à des hémorragies digestives. Ces manifestations peuvent représenter une menace vitale.

Il existe également une grande variabilité quant à l'âge d'apparition, la sévérité et les manifestations cliniques dans et entre familles porteuses d'une mutation identique indiquant que des facteurs épigénétiques et environnementaux sont impliqués dans le développement de cette maladie génétique vasculaire complexe.

Nos travaux ont pour but : 1) de déterminer les mécanismes moléculaires responsables du développement de la MRO, 2) de générer des modèles qui reproduisent les malformations vasculaires de la MRO, 3) de cribler des molécules capables d'avoir des effets bénéfiques sur la MRO et 4) de disséquer les mécanismes d'action de ces molécules.

#### Expression tissulaire du récepteur endogline et localisation des anomalies vasculaires

Le mécanisme responsable du développement de la MRO est une haplo-insuffisance. Les souris *eng<sup>+/-</sup>* et *acvrl1<sup>+/-</sup>* sont viables mais elles développent à l'âge adulte des signes cliniques de la MRO. Cependant, la localisation des lésions au niveau de lits vasculaires spécifiques restait inexpliquée. Nous avons montré qu'il existe une association entre les niveaux d'expression de l'endogline et la prévalence d'apparition des malformations vasculaires au niveau de lits vasculaires spécifiques. Ainsi, la peau, les intestins, les poumons et le cerveau – organes majeurs affectés chez les patients MRO – expriment des niveaux faibles d'endogline en comparaison des autres organes analysés. L'analyse *in toto* de la peau en immunofluorescence révèle que les artérioles et les capillaires – où les défauts d'association entre les cellules endothéliales et murales sont détectés – expriment des niveaux faibles par rapport aux veines et veinules. Ces résultats sont confirmés *in vitro* : une diminution de 50 % des niveaux d'expression d'endogline dans les cellules endothéliales artérielles (faibles niveaux d'endogline) est associée à une dérégulation des fonctions cellulaires alors qu'une inhibition de 80 % des niveaux d'endogline est nécessaire pour qu'apparaisse un phénotype au niveau des cellules endothéliales veineuses. Nos données complètent les travaux réalisés par le groupe de R. Akhurst qui rapporte que *ENG* est un gène modificateur dont les variations

d'expression expliquent en partie l'hétérogénéité clinique de la maladie. Ces résultats font l'objet d'un article en préparation.

#### Inflammation et développement des anomalies vasculaires

L'analyse des souris MRO révèle que ces animaux présentent des défauts généralisés de recouvrement des vaisseaux sanguins par les cellules murales associés à une hypervascularisation de certains tissus. En revanche, ces animaux ne forment que très rarement des *shunts* artério-veineux. Cependant, plusieurs études récentes utilisant les souris *eng<sup>flox/flox</sup>* et *acvr1<sup>flox/flox</sup>* suggèrent que l'apparition des *shunts* est dépendante d'un second « hit », comme la cicatrisation. Nous avons précédemment démontré que les mécanismes de l'angiogenèse post-natale étaient perturbés chez les souris MRO. Par ailleurs, il existe des défauts de réparation vasculaire et un déficit de recrutement et d'activation des cellules mononuclées circulantes associés au développement de cette pathologie. L'inflammation est un puissant stimulateur du remodelage vasculaire. Nous proposons d'étudier le rôle de l'inflammation dans le développement des malformations vasculaires associées à la MRO. Une inflammation des voies aériennes induite par *Mycoplasma pulmonis* (*M. pulmonis*) induit une inflammation chronique (type asthme par *Mycoplasma pneumoniae* chez l'homme) avec un remodelage important du réseau vasculaire de la trachée visible par immunomarquage *in toto*. Nous montrons que les souris MRO infectées par *M. pulmonis* présentent des hémorragies importantes au niveau des poumons. La trachée des souris mutantes présente une hypervascularisation du réseau vasculaire par rapport aux contrôles et la présence de nombreux *shunts* artério-veineux, démontrant que l'inflammation joue un rôle important dans l'apparition des malformations vasculaires dans un contexte MRO. Ces résultats font l'objet d'un article en préparation.

#### Modèle de différenciation des cellules souches embryonnaires / cellules pluripotentes induites pour l'étude du développement des anomalies vasculaires associés à la MRO

La différenciation des cellules souches embryonnaires (ES) en gel de collagène permet d'étudier les étapes de formation des cellules endothéliales (vasculogénèse) et leur organisation en un réseau vasculaire primitif avec recrutement des cellules murales (angiogénèse). Nous avons confirmé en utilisant ce modèle *in vitro* que le récepteur endogline n'intervenait pas dans les étapes de vasculogénèse mais qu'il était un régulateur essentiel de l'angiogénèse par bourgeonnement. Les cellules ES *eng<sup>-/-</sup>* sont incapables de former un tube vasculaire à partir des îlots endothéliaux alors que les cellules ES *eng<sup>+/-</sup>* forment des réseaux vasculaires complexes avec une augmentation importante du nombre de cellules endothéliales « tip », suggérant que ce récepteur joue un rôle important dans la spécification des cellules endothéliales et que ce modèle mime le phénotype de la souris MRO.

#### La thalidomide stimule la maturation vasculaire et réduit les épistaxis chez les patients atteints de maladie de Rendu-Osler

Nous avons testé la thalidomide chez un groupe de patients atteints de MRO [14]. La thalidomide est un dérivé de l'acide glutamique utilisé dans les années 50 comme sédatif et anti-émétique notamment chez les femmes enceintes. Or il s'est avéré qu'il provoquait de graves malformations congénitales et il fut retiré du marché suite à un scandale sanitaire mondial sans précédent. Cependant, la mise en



évidence de propriétés pharmacologiques originales, en particulier comme modulateur du système immunitaire, de l'inflammation et comme inhibiteur de la croissance des vaisseaux sanguins (angiogénèse) ont conduit à de nouvelles indications de la thalidomide dans des maladies inflammatoires, tumorales et hémorragiques.

L'administration orale de thalidomide réduit fortement la fréquence et la durée des épistaxis, avec une augmentation significative du taux d'hémoglobine et une suppression du besoin en transfusion sanguine chez les patients MRO. Nous avons découvert un nouveau mode d'action pour ce médicament en montrant que la thalidomide stimule fortement le recrutement des cellules murales au niveau des vaisseaux sanguins. En favorisant la maturation du réseau vasculaire, la thalidomide permet de compenser les déficits de recouvrement caractéristiques de la MRO et certainement de réduire les saignements associés à la MRO. Sur le plan moléculaire, nous avons montré que la signalisation du Platelet Derived Growth Factor-B (PDGF-B) joue un rôle important dans la maturation du réseau vasculaire, induite par la thalidomide. Nos travaux valident le ciblage des cellules murales comme nouvelle stratégie thérapeutique pour le traitement des malformations vasculaires

#### PUBLICATIONS DU LABORATOIRE 2010-2011

1. Koch A.W., Mathivet T., Larrivé B., Tong R.K., Kowalski J., Pibouin-Fragner L., Bouvrée K., Stawicki S., Nicholes K., Rathore N., Sclaes S.J., Luis E., Del Toro R., Freitas C., Bréant C., Michaud A., Corvol P., Thomas J.-L., Wu J., Peale F., Watts R.J., Tessier-Lavigne M., Bagri A. et Eichmann A., « Robo4 maintains vessel integrity and inhibits angiogenesis by interacting with UNC5B », *Dev. Cell*, 20, 2011, 33-46.
2. Calvo C.F., Fontaine R.H., Soueid J., Tamela T., Makkinen T., Alfaro-Cervello C., Bonnaud F., Miguez A., Benhaim L., Xu L., Barallobre M.J., Moutkine I., Lyytikä J., Tatlisumak T., Pytowski B., Zalk B., Richardson W., Kassaris N., Garcia-Verdugo J.M., Alitalo K., Eichmann A. et Thomas J.-L., « Vascular endothelial growth factor receptor 3 directly regulates murine neurogenesis », *Genes & Dev*, 25, 2011, 831-844.
3. Flamant M., Bollée G., Schordan S., Fligny C., Rumpel E., Milon M., Schordan E., Sabaa N., Vandermeersch S., Galaup A., Rodenas A., Casal I., Sunnarborg S.W., Salant D.J., Kopp J.B., Threadgill D.W., Quaggin S.E., Dussaule J.-C., Germain S., Mesnard L., Endlich L., Boucheix C., Belenfant C., Callard P., Endlich N. et Tharaux P.L., « The Epidermal Growth Factor Receptor promotes glomerular injury and renal failure in rapidly progressive crescentic glomerulonephritis; the identification of possible therapy », *Nat. Med.*, 2011 (sous presse).
4. Desch M., Harlander S., Neubauer B., Gerl M., Germain S., Castrop H. et Todorov V.T., « cAMP target sequences enhCRE and CNRE sense low-salt intake to increase human renin gene expression *in vivo* », *Pflugers Arch.*, 461, 2011, 567-577.
5. Riediger F., Quack I., Qadri F., Hartleben B., Park J.-K., Potthoff S., Sohn D., Sihn G., Rousselle A., Fokuhl V., Maschke U., Purfuerst B., Schneider W., Luft F.C., Dechend R., Bader M., Huber T.B., Nguyen G. et Müller D.N., « Prorenin receptor is essential for podocyte autophagy and survival in mice », *JASN* (sous presse).
6. Nguyen G., « Renin, (pro)renin and receptor: an update », *Clin. Sci*, 120, 2011, 169-178.
7. Nguyen G., « Renin and Prorenin Receptor in Hypertension: What's New? », *Curr. Hypertens Rep.*, 13, 1, 2011, 79-85.
8. Volpe M., Azizi M., Danser A.H.J., Nguyen G. et Ruilope L.M., « Twisting arms to angiotensin receptor blockers/antagonists: the turn of cancer », *Eur. Heart J.*, 32, 2011, 19.

9. Leroux-Berger M., Queguiner I., Maciel T.T., Ho A., Relaix F. et Kempf H., « Pathologic calcification of adult vascular smooth muscle cells differs on their crest or mesodermal origin », *J. Bone Miner. Res.*, 26, 2011, 1543-1553.
10. Kamel C.N., Kempf H., Yelin R., Daoud G., James R.G., Lassar A.B., Tabin C.J. et Schultheiss T.M., « Promotion of avian endothelial cell differentiation by GATA transcription factors », *Dev. Biol.*, 353, 2011, 29-37.
11. Avouac J., Clemessy M., Distler J.H., Gasc J-M., Ruiz B., Vacher-Lavenu M.C., Wipff J., Kahan A., Boileau C., Corvol P. et Allanore Y., « Enhanced expression of ephrins and thrombospondins in the dermis of patients with early diffuse systemic sclerosis: potential contribution to perturbed angiogenesis and fibrosis », *Rheumatology*, 50, 2011, 1494-1504.
12. Michaud A., Bur D., Gribouval O., Muller L., Iturrioz X., Clemessy M., Gasc J-M., Gubler M-C. et Corvol P., « Loss of function point mutations associated with renal tubular dysgenesis provide insights about renin function and cellular trafficking », *Hum. Mol. Genet.*, 20, 2011, 301-311.
13. Del Toro R., Prahst C., Mathivet T., Siegfried G., Kaminker J., Larrivée B., Bréant C., Duarte A., Takakura N., Fukamizu A., Penninger J et Eichmann A., « Identification and functional analysis of novel endothelial tip cell enriched genes », *Blood*, 116, 2010, 4025-4033.
14. Adams RH, Eichmann A., « Axon guidance molecules in vascular patterning. In: wiring the brain: the biology of neuronal guidance », *Cold Spring Harbor Perspect. Biol.*, 2, 2010, a001875 (Epub).
15. Germain S, Eichmann A., « VEGF and Ephrin-B2 : a bloody duo », *Nat. Med.*, 16, 2010, 752-754.
16. Germain S, Monnot C, Muller L., « Hypoxia-driven angiogenesis: role of tip cells and extracellular matrix scaffolding », *Curr. Op. Hematol.*, 17, 2010, 245-251.
17. Verine J., Lehmann-Che J., Soliman H., Feugeas J.P., Vidal J.S., Mongiat-Artus P., Belhadj S., Philippe J., Lesage M., Wittmer E., Chanel S., Couvelard A., Ferlicot S., Rioux-Leclercq N., Vignaud J.M., Janin A. et Germain S., « Determination of angptl4 mRNA as a diagnostic marker of primary and metastatic clear cell renal-cell carcinoma », *PLoS One*, 5, 2010, 5, e10421.
18. Lebrin F., Srun S., Raymond K., Martin S., van den Brink S., Freitas C., Bréant C., Mathivet T., Larrivée B., Thomas J.L., Arthur H.A., Westermann C.J.J., Disch F., Mager J.J., Snijder R.J., Eichmann A.\* et Mummery C.\*, « Thalidomide enhances mural cell recruitment and reduces epistaxis in patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia », *Nat. Med.*, 16, 2010, 420-428.
19. Maciel T.T., Kempf H. et Campos A.H., « Targeting bone morphogenetic protein signaling on renal and vascular diseases », *Cur. Op. Nephrol. Hypertens.*, 19, 2010, 26-31.
20. Grünfeld J.P., Hwu W. et al., « More on clinical renal genetics », *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.*, 5, 2010, 563-567.
21. Corvol P., « Molecular bases of tumor angiogenesis », *Ann. Pathol.*, 30 (suppl. 1), 2010, 32-36.

---

\* Contributions égales.

## LISTE DES DIPLÔMÉS

**Thèses**

– Christelle Cousin, thèse de doctorat de l'université Paris 7 Diderot, soutenue le 10 décembre 2010 : *Le récepteur de la (pro)rénine : caractérisation d'une nouvelle forme soluble et rôle dans la calcification vasculaire médiée par la voie Wnt/ $\beta$ -caténine.*

– Sébastien Gauvrit, thèse de doctorat de l'université Pierre et Marie Curie, spécialité physiologie et physiopathologie, soutenue le 27 septembre 2011 : *Rôle de l'interférence ARN dans le contrôle épigénétique de la séparation veino-lymphatique et de l'hématopoïèse.*

**Master 2**

– Virginie Lelarge, master de l'université Pierre et Marie Curie, soutenu le 28 juin 2011 : *Rôle de la lysyl oxydase like-2 (LOXL2) dans l'angiogenèse tumorale in vivo.*

– Cécile Le Naoures, master de l'université Paris 12, biologie-santé, école doctorale de cancérologie, soutenu le 21 juin 2011 : *La thalidomide stimule la maturation vasculaire : Implication dans les traitements anti-cancéreux.*

