

Médecine expérimentale

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

ANGIOGENÈSE BASES FONDAMENTALES ET APPLICATION PHYSIOPATHOLOGIQUE

Le cours de la Chaire de Médecine Expérimentale, « Angiogenèse — Bases Fondamentales et Applications Physiopathologiques » a traité de trois sujets principaux : l'ontogenèse des vaisseaux coronaires, les relations entre angiogenèse et neurogenèse, la découverte de nouveaux gènes spécifiques de différents types d'endothélium vasculaire normal ou pathologique.

Ontogenèse des vaisseaux coronaires. Angiogenèse thérapeutique au niveau du cœur

La vascularisation primitive du cœur se fait par vasculogenèse. Le myocarde est recouvert par un manteau de cellules sous-épicardiques, précurseurs des vaisseaux coronaires. Ce réseau pénètre dans la racine de l'aorte, formant les vaisseaux coronaires. Le réseau coronaire se développe notablement en période post-natale avec une angiogenèse marquée lors de la première année de la vie grâce au fibroblast growth factor (FGF) et au vascular endothelial growth factor (VEGF). L'infarctus du myocarde entraîne la mise en jeu de l'hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α), du fait de l'hypoxie, et s'accompagne d'une expression du VEGF, ainsi qu'il a été montré dans des biopsies myocardiques effectuées lors de chirurgie coronaire chez des patients au décours immédiat d'un infarctus. Outre la possibilité de créer des néovaisseaux par l'expression *in situ* de ces facteurs angiogéniques, les patients ayant eu un infarctus du myocarde aigu développent aussi une néoangiogenèse grâce à la mobilisation de cellules endothéliales progénitrices. L'importance de la participation de ces cellules aux néovaisseaux myocardiques est difficile à évaluer. Toutefois, Kuaini *et coll.* ont montré (N. Engl. J. Med. 346 : 5, 2002) qu'un greffon cardiaque féminin implanté chez un receveur

masculin était colonisé par des cellules progénitrices provenant du receveur. Le nombre des cellules du receveur dans le cœur du donneur était loin d'être négligeable puisque 18 % des myocytes, 20 % des artérioles et 14 % des cellules des artères coronaires possédaient le marqueur chromosomique Y du receveur. Ceci montre la capacité qu'a l'organisme à mobiliser, dans certaines conditions, telles que l'hypoxie et l'inflammation, des cellules souches progénitrices provenant vraisemblablement en grande partie de la moelle sanguine et capables de se différencier en cellules endothéliales mais aussi en cellules musculaires lisses vasculaires.

Accroître l'angiogenèse est une solution thérapeutique logique pour augmenter l'apport d'oxygène et de nutriments dans un territoire myocardique ischémique. De nombreuses questions se posent sur le type de vaisseaux à cibler afin de développer une circulation collatérale efficace (capillaires péri-infarctus ou artérioles), sur le type de facteur de croissance (VEGF, FGF, ...). La voie d'abord à utiliser, vasculaire, intramyocardique ou intrapéricardique, est débattue. D'autres stratégies que l'utilisation de gènes ou de protéines recombinantes sont étudiées expérimentalement, telles que la mobilisation par des chimiokines ou des cytokines (telles que le GM-CSF) des cellules endothéliales progénitrices d'origine médullaire. Une autre alternative est l'implantation de ces progéniteurs chez le patient après culture et expansion *in vitro* de ses propres progéniteurs sanguins circulants. L'objectif à long terme de la thérapie angiogénique dans l'infarctus du myocarde est d'obtenir une diminution de la morbi-mortalité coronaire mais les résultats des premières études réalisées ne portent que sur des critères intermédiaires (amélioration des tests d'effort ; augmentation de la perfusion myocardique).

Une douzaine d'études cliniques ont été rapportées, la plupart d'entre elles concernent l'utilisation de protéines recombinantes, le FGF et le VEGF. Ces études intéressent le plus souvent un nombre limité de patients ; une seule a été effectuée en double aveugle. L'étude rapportée par Henry *et coll.* n'a pas montré de différence significative de la perfusion myocardique lors de la scintigraphie cardiaque effectuée 60 ou 120 jours après traitement par le VEGF recombinant (Circulation, abstr, 1999). L'étude la plus importante, effectuée avec du FGF recombinant chez 337 patients (FIRST Trial) montre une discrète amélioration des symptômes mais une absence d'amélioration des tests d'effort ou de la scintigraphie myocardique, en dehors peut être des patients les plus graves (Post *et coll.*, Cardiovasc. Res. 49 : 522, 2001).

Les difficultés rencontrées avec ce type d'étude proviennent d'un effet placebo fréquent chez l'insuffisant cardiaque, de la réalisation ardue des essais randomisés et en double aveugle dans cette pathologie, des effets secondaires de certaines molécules telles que le VEGF. De là, un certain recul vis à vis de l'enthousiasme initial pour la thérapie angiogénique myocardique, telle qu'elle est reflétée par une série de titres d'articles ou d'éditoriaux en 2000 et 2001 dans les revues spécialisées en cardiologie. L'angiogenèse thérapeutique cardiaque bénéficie seu-

lement maintenant de l'accroissement des connaissances sur les mécanismes cellulaires et moléculaires du développement vasculaire. Peut-être ne faut-il pas s'adresser à une molécule unique superpuissante telle que le VEGF mais envisager une combinaison de molécules, voire encore utiliser des précurseurs des cellules endothéliales capables de générer des néovaisseaux par mobilisation des précurseurs médullaires par des cytokines, ou par culture *ex vivo* des cellules endothéliales du patient suivie de réimplantation.

Angiogenèse et Neurogenèse

Il existe de nombreuses convergences entre le système vasculaire et le système nerveux : tous les deux sont des réseaux ramifiés unidirectionnels avec de nombreuses bifurcations, des circuits intégrés (information périphérique amenée à un centre de contrôle et retour à la périphérie) ; ils sont organisés de façon similaire par des constituants cellulaires (neurones et cellules gliales pour les nerfs ; cellules endothéliales et musculaires lisses de la paroi vasculaire pour les vaisseaux). En outre, de nombreuses molécules sont partagées par les deux systèmes telles que les neuropilines et les sémaphorines, les ephrines et leurs récepteurs, le système de signalisation Notch, ... Ainsi, par exemple, la neuropiline 1 est le récepteur de la sémaphorine 3 responsable de la régression du cône de croissance et de la répulsion des neurites *in vitro*. La même neuropiline 1 est aussi le co-récepteur du VEGF 165 et participe à l'effet mitogénique de ce récepteur sur les cellules endothéliales. La transgenèse additive de la neuropiline 1 entraîne des anomalies vasculaires à type d'hémorragie et de dilatation vasculaire ainsi que des anomalies du développement des axones. L'inactivation génique de la neuropiline 1 entraîne une létalité embryonnaire, un développement anormal à la fois du système nerveux et du système cardiovasculaire qui est insuffisant et retardé. L'addition de dimères de neuropiline 1 à des cultures d'embryons de souris neuropiline 1 *-/-*, permet de rétablir un développement vasculaire normal. Ainsi, cette molécule décrite initialement comme molécule de guidage des neurones s'avère-t-elle essentielle dans la croissance et le guidage du système endothélial vasculaire.

À l'inverse, le VEGF, décrit initialement comme facteur de croissance des cellules endothéliales, est capable de stimuler la croissance axonale. Il exerce un effet neurotrophique sur des explants de ganglion cervical supérieur et de la racine dorsale de l'aorte. Il favorise la survie des neurones, des cellules satellites et des cellules de Schwann *in vitro*. *In vivo*, le transfert d'un plasmide codant pour le VEGF atténue la progression de la neuropathie sensitivo-motrice qui se développe au cours de l'ischémie périphérique chez le lapin dont l'artère fémorale a été occluse. L'action du VEGF serait lié à l'augmentation du nombre de vaisseaux dans le nerf péroné (augmentation de la perfusion *via* les vasa nervorum) ainsi qu'à un effet anti-apoptotique sur les cellules de Schwann (J. Isner *et coll.*, Nature 6 : 405, 2001). De même, le transfert du VEGF au cours de la neuropathie diabétique expérimentale induite chez le rat par la streptozotocine

ou l'alloxane améliore la vitesse de conduction nerveuse sensitive et motrice. Le mécanisme d'action serait là encore un rôle protecteur de l'ischémie des microvaisseaux irriguant les nerfs, tel qu'on peut l'apprécier par le maintien du flux sanguin et la conservation d'une morphologie normale des nerfs lors du traitement par le VEGF.

L'importance du VEGF dans la protection neuronale est encore montrée par une série de travaux remarquables menés par l'équipe de P. Carmeliet *et coll.* qui a réalisé une délétion ciblée d'un élément de réponse hypoxique situé sur le gène du VEGF, en amont de la région codante (Nat. Genet. 28 : 131, 2001). Ils ont observé chez la souris adulte une fatigabilité musculaire, une dégénérescence des motoneurones, une diminution des potentiels d'action des unités motrices au niveau des neurones de la corne ventrale de la moelle épinière. Cette atteinte progressive et sélective des motoneurones des pattes postérieures mime en tout point les lésions observées dans la sclérose latérale amyotrophique chez l'homme. Le mécanisme d'action du VEGF à ce niveau pourrait être double : maintien de la perfusion des vaisseaux à destinée neuronale (qui seraient particulièrement sensibles à l'hypoxie au niveau de la corne antérieure de la moelle) et effet anti-apoptotique du VEGF. Cet effet de survie cellulaire serait le fait à la fois du récepteur R2 du VEGF et de la neuropiline 1.

Découverte de gènes spécifiquement exprimés dans différents types d'endothélium vasculaire normal ou pathologique

La recherche de nouveaux gènes et de nouvelles protéines impliquées dans l'angiogenèse normale et pathologique se fait actuellement par le criblage systématique de gènes ou de protéines différentiellement exprimées dans l'endothélium vasculaire. Saint-Croix *et coll.* ont comparé l'expression de gènes de l'endothélium de vaisseaux tumoraux provenant de cancer colorectal à ceux de vaisseaux provenant du même tissu sain (Science 289 : 1197, 2000). Les gènes ont été analysés par la technique de Serial Analysis Gene Expression (SAGE). De nouveaux gènes spécifiques de l'endothélium normal et tumoral ont été ainsi découverts, certains d'entre eux correspondant à des séquences courtes d'ARN messagers transcrits et non complètement identifiés (expressed sequence tags, ESTs). Cette étude montre la présence de nombreux gènes en commun dans les deux types d'endothélium, normal et tumoral. On note la présence de plusieurs gènes spécifiquement exprimés dans l'endothélium tumoral, et ceci quelque soit le type de tumeur. Certains de ces gènes sont aussi exprimés dans des circonstances de néoangiogenèse physiopathologique telles que l'angiogenèse du corps jaune ou l'angiogenèse observée lors de la cicatrisation. Ceci indique que les mêmes signaux sont utilisés au cours des processus tumoraux et au cours de l'angiogenèse physiologique, faisant ainsi de l'angiogenèse tumorale une angiogenèse similaire à celle observée au cours d'une blessure « non cicatrisée ».

Un autre exemple de recherche de gènes spécifiquement exprimés par les cellules endothéliales est celui des cellules endothéliales humaines soumises à

des conditions d'hypoxie chimique ou gazeuse et pour qui, en utilisant la technique du cDNA Representational Difference Analysis, notre laboratoire a identifié 350 gènes différents induits par l'hypoxie. 75 % de ces gènes étaient connus, 25 % correspondaient à des ESTs. Parmi les gènes déjà connus, 40 % étaient en rapport avec l'hypoxie (gènes liés au métabolisme cellulaire anaérobie, gènes de l'apoptose, facteurs de croissance, ...). 60 % des gènes identifiés n'étaient pas connus pour être induits par l'hypoxie. La validation de ces gènes déjà identifiés, mais non connus pour être induits par l'hypoxie, implique plusieurs étapes : étude de leur expression dans des situations d'ischémie tissulaire telles que celle de l'ischémie critique des membres inférieurs chez l'homme ; quantification des ARN messagers lors des cultures de cellules endothéliales hypoxiques et dans des tissus ischémiques ; étude de l'expression de la protéine correspondante ; recherche des propriétés angiogéniques putatives de la protéine codée par le gène dans des systèmes *in vitro* et *in vivo*.

L'étude systématique de facteurs de croissance de l'endothélium des glandes endocrines par criblage de protéines sécrétées et mitogènes pour les cellules endothéliales de glandes surrénales a permis à l'équipe de Ferrara *et coll.* de découvrir un nouveau gène, l'Endocrine Gland Derived-VEGF : EG-VEGF (Nature 412 : 877, 2001). Ce gène est l'autologue humain d'une protéine appelée VPRA, Venum Protein A. L'EG-VEGF induit la fenestration de l'endothélium des glandes endocrines et agit en coopération avec le VEGF. Comme lui, il est induit par l'hypoxie. À l'inverse du VEGF dont l'expression est ubiquitaire, l'EG-VEGF est exprimé de façon très spécifique dans les tissus stéroïdogéniques. L'EG-VEGF n'exerce pas d'effet angiogénique dans les tests classiques d'angiogenèse (cornée du lapin, ...) mais induit une angiogenèse massive ainsi que la formation de kystes après injection intra-ovarienne. Ce gène joue donc un rôle unique dans la croissance et la fenestration de l'endothélium des tissus stéroïdogéniques et pourrait jouer un rôle physiopathologique dans la maladie polykystique ovarienne et peut être dans le syndrome d'hyperstimulation ovarienne.

P. C.

RAPPORT D'ACTIVITÉ DU LABORATOIRE

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

Équipe : P. CORVOL, C. HUBERT, M. PAGANO, C. MONNOT, L. MULLER, K. BERNSTEIN, M. GERVAIS-TAUREL, K. FRENZEL, A. MICHAUD, A. BARRET, X. HOUARD, S. FUCHS, C. DUGOURD, A. CAZÈS, J. PHILIPPE, C. ARDIDIE, C. SOUNDARAMOURTY, E. ÉTIENNE

Le système rénine-angiotensine et les endothélines jouent un rôle essentiel dans la vasomotricité mais aussi dans la structure de la paroi vasculaire. Les objectifs de l'équipe sont : 1) l'étude du rôle respectif que jouent les deux sites

actifs de l'enzyme de conversion (ACE), 2) la caractérisation approfondie d'une nouvelle voie de signalisation cellulaire de l'angiotensine II aboutissant à un effet mitogénique, et son rôle fonctionnel, 3) la compartimentalisation subcellulaire des isoformes de l'enzyme de conversion de l'endothéline (ECE) et son effet dans le métabolisme des peptides vasoactifs, 4) le rôle de la fibronectine protéinase dans le remodelage vasculaire.

1. L'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE) — Rôle respectif des deux sites catalytiques de l'ACE

Du fait d'une duplication génique, l'ACE possède deux sites actifs (appelés domaines N et C) qui diffèrent par leur sensibilité au chlore, la préférence de certains substrats et d'inhibiteurs (IEC) tels que le captopril. Nous avons montré que le térapeptide AcSDKP, régulateur négatif de l'hémopoïèse, était clivé préférentiellement par le domaine N. Le pseudopeptide phosphinique RXP407, synthétisé et étudié en collaboration avec V. Dive (CEA, Saclay), inhibe 1 000 fois plus le domaine N que le domaine C. Afin d'approfondir le rôle respectif de chacun de ces sites, ce programme a pour objectifs :

a) Inhibition sélective des domaines N et C. Importance physiopathologique et application thérapeutique potentielle

L'inhibition sélective du domaine N par le RXP407 aboutit à une élévation de l'AcSDKP plasmatique, ceci sans effet notable sur la pression artérielle car la conversion de l'angiotensine I en angiotensine II est toujours assurée par le domaine C. Un protocole en cours vise à savoir si l'inhibition du domaine N par le RXP407 permettrait, par l'élévation sélective d'AcSDKP, de protéger la moelle osseuse lors d'une irradiation subléthale et de prolonger la survie des animaux. Cette recherche associe l'unité INSERM U362 (Dr W. Vainchenker), le CEA (Drs E. Ezan et V. Dive) et les laboratoires Servier. Le but ultime de cette recherche est d'envisager l'utilisation d'un inhibiteur sélectif du domaine N de l'ACE comme thérapeutique adjuvante et transitoire de protection des progéniteurs hémopoïétiques médullaires, lors de chimiothérapies agressives. Une telle stratégie éviterait la chute tensionnelle que pourrait provoquer un IEC non sélectif.

L'inactivation du gène de l'ACE par recombinaison homologue a confirmé le rôle attendu de cette enzyme dans la régulation de la pression artérielle et du métabolisme hydrosodé. En outre, les animaux dont le gène de l'ACE a été invalidé ont des anomalies du développement rénal, sont profondément anémiques et les mâles ont une hypofertilité marquée. Afin de connaître les conséquences de l'inactivation du domaine N ou du domaine C durant le développement, un programme d'inactivation génique sélective de ces domaines a été entrepris. Deux vecteurs de recombinaison ont été construits pour supprimer l'activité enzymatique des domaines N et C. Dans les deux cas, les deux histidines du site catalytique ont été remplacées par des lysines qui ne peuvent plus

lier l'atome de zinc indispensable à la catalyse. L'équipe du Dr K. Bernstein (Dept of Pathology, Emory Univ., Atlanta, USA) a inactivé le site catalytique du domaine N et des souris hétérozygotes devraient être obtenues prochainement. Notre équipe inactive le domaine C par une construction où une cassette de sélection à la néomycine est flanquée de deux séquences loxP afin qu'elle puisse être éliminée après qu'ait eu lieu la recombinaison homologe.

Ces souris seront d'excellents modèles pour connaître le rôle de chaque domaine de l'ACE dans le métabolisme de l'angiotensine et de la bradykinine, et surtout dans le développement rénal, le contrôle de l'hémopoïèse et de la fertilité masculine.

b) Étude du site actif de l'ACE par mutagenèse dirigée

Nous poursuivrons l'étude du site actif de l'ACE par la recherche de l'acide aminé basique (arginine) qui interagit avec le groupe carboxyterminal du substrat. L'alignement du site actif de l'ACE de drosophile (qui ne possède qu'un domaine catalytique) avec celui de la carboxypeptidase A suggère que l'Arg485 pourrait interagir avec le substrat. Cette arginine sera mutée dans l'ACE de drosophile par une glutamine ou un glutamate et, dans un deuxième temps, l'arginine équivalente de l'ACE de mammifère sera mutée. Les enzymes recombinantes correspondantes seront exprimées, purifiées et leurs propriétés vis à vis de différents substrats et inhibiteurs seront étudiées. Ceci permettra d'affiner le modèle du site actif de l'ACE pour lequel le laboratoire a déjà accumulé de nombreuses données.

2. Récepteur de l'angiotensine de type 1 (AT₁)

Ce projet de recherche consiste en l'analyse des voies de signalisation activées par le récepteur de l'angiotensine de type 1 (AT₁) stimulant la prolifération des cellules musculaires lisses au cours de la progression des maladies vasculaires ou de la resténose. Une dissection des voies de signalisation sera effectuée dans un premier temps dans le modèle des cellules CHO recombinantes. L'importance de cette voie de signalisation sera ensuite évaluée dans des modèles animaux.

a) Contribution de la voie PI3K/Akt à la prolifération cellulaire en réponse à l'AngII dans les lignées cellulaires établies de CHO

Dans les cellules CHO surexprimant les récepteurs AT_{1A} et ayant une réponse proliférative nette à l'AngII, les deux voies de signalisation activant les kinases Erk1 /Erk2 (ou p42/p44 MAPKs) ou PKB/Akt sont activées par l'AngII. L'inhibition de la phosphoinositide 3-kinase (PI3K) entraîne un blocage à la fois de la phosphorylation d'Akt et de la synthèse d'ADN induite par l'AngII alors qu'elle n'affecte pas l'activité des Erk1/2. Une approche par mutagenèse dirigée est effectuée afin d'étudier deux mutants. Le mutant Glu/Asn74 du récepteur AT₁ qui est incapable d'induire un effet prolifératif et qui possède une cinétique

d'activation des voies PI3K/Akt et Erk1/2 défectueuse et, par ailleurs, le mutant dominant-négatif de l'Akt1 décrit par Dimmeler *et al.* De plus, la surexpression spécifique des isoformes de l'Akt sera réalisée afin de déterminer leurs rôles respectifs dans l'induction de la réponse mitogénique. Ces travaux permettront : a) d'établir une corrélation entre l'activation de la voie PI3K/Akt et la réponse proliférative à l'AngII, et b) de connaître la spécificité d'action des trois isoformes d'Akt dans la prolifération cellulaire induite par l'AngII via AT₁.

b) Contribution des Erk1/2 à la prolifération cellulaire en réponse à l'AngII dans les lignées cellulaires établies de CHO

Les inhibiteurs de MEK1, kinase phosphorylant Erk1/2, entraînent un blocage à la fois de la phosphorylation d'Erk1 et 2 et de la synthèse d'ADN induite par l'AngII alors qu'ils n'affectent pas l'activité d'Akt. La contribution des Erk1/2 dans la réponse proliférative sera appréciée grâce la protéine PEA-15 (Phosphoprotéine Enrichie dans les Astrocytes, d'un poids moléculaire de 15 kDa) dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe du Dr H. Chneiweiss (INSERM U114). Cette protéine lie Erk1 et Erk2 sans modifier la phosphorylation de ces kinases, et localise leur activité dans le cytoplasme grâce à un export nucléaire permanent. Des lignées de CHO surexprimant AT_{1A} seuls ou avec PEA-15 étiquetée avec la GFP sont en cours de caractérisation. Ce travail permettra de vérifier a) si l'interaction de PEA-15 avec Erk1/2 aboutit à une inhibition de la prolifération cellulaire, b) le mécanisme intervenant dans la localisation nucléaire des Erk1/2 et c) si la localisation nucléaire des Erk1/2 est nécessaire à la réponse proliférative médiée par AT₁.

c) Localisation subcellulaire d'Akt — Implication dans la réponse proliférative à l'angiotensine II

Les conséquences fonctionnelles de la localisation cytoplasmique ou nucléaire de l'Akt active seront étudiées grâce à une lignée CHO co-exprimant AT_{1A} et l'isoforme Akt1 étiquetée par HA, construite au laboratoire. Les premières expériences montrent une localisation cytoplasmique d'Akt dans la cellule non stimulée. L'étude du trafic intracellulaire d'Akt1 sera étudié après application d'agonistes ou d'antagonistes d'AT₁, ainsi qu'après prétraitement par les inhibiteurs de PI3K ou d'Akt. Les résultats seront rapportés à la réponse aux facteurs de croissance. Ultérieurement, le rôle de signaux d'adressage nucléaire sera étudié par des mutants d'Akt ne pouvant plus migrer dans le noyau ou au contraire ayant un adressage nucléaire spécifique permanent. Les lignées établies seront étudiées pour leur capacité à proliférer en réponse à l'AngII.

d) Importance physiopathologique de la voie PI3K/Akt dans des modèles expérimentaux de pathologie vasculaires

Cette partie concerne l'analyse des voies de signalisation mises en jeu au cours de la progression des plaques athéromateuses ou de la resténose après agression

vasculaire. Cette approche sera réalisée sur un modèle de prolifération néointimale de la carotide chez la souris hypercholestérolémique et athéromateuse ApoE *-/-* ou dans le modèle d'expression de récepteurs AT₁ constitutivement actifs, en collaboration avec l'équipe d'E. Clauser (EPI 0103). Après agression de la carotide par dilatation artérielle et insufflation d'air, les cinétiques d'expression des Akt1, 2 et 3 et des isoformes de PI3K seront étudiées respectivement par hybridation *in situ* et immunohistochimie. De plus, des études de la phosphorylation des Akt seront réalisées sur des prélèvements provenant de ces mêmes carotides. L'administration d'antagonistes des AT₁ et(ou) d'inhibiteurs des voies PI3K ou Erk1/Erk2 sera réalisée avant lésion afin de voir si l'inhibition de ces signalisations intracellulaires peut moduler la migration et la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires. Enfin, l'existence de souris déficientes en Akt1 par inactivation génique sera un outil intéressant pour l'étude de cette voie de signalisation en réponse à l'angiotensine II *in vitro* et *in vivo*.

3. Compartimentalisation subcellulaire et activité protéolytique des isoformes de l'enzyme de conversion de l'endothéline

L'enzyme de conversion de l'endothéline (ECE-1) assure la biosynthèse d'endothéline à partir de son précurseur. Ce peptide agit par des effets autocrines et paracrines. Sa production est donc contrôlée localement, ce qui fait de l'ECE l'enzyme clé de l'activation du système endothéline.

L'ECE-1 a une large distribution tissulaire, au niveau des systèmes cardiovasculaire et endocrine, ainsi qu'au cours du développement. Il existe 4 isoformes de l'ECE-1 produites à partir d'un gène unique par des promoteurs alternes. Ces isoformes ont la même activité catalytique luminale/extracellulaire, et ne diffèrent entre elles que par leur domaine cytosolique. Nos objectifs sont de caractériser les sites d'action intra- et extracellulaires de l'ECE, et de rechercher d'autres substrats physiologiquement importants. Ces informations sont nécessaires à l'analyse du mode d'action des inhibiteurs de l'ECE.

a) Analyse du trafic intracellulaire, identification des signaux de tri et analyse de l'hétérodimerisation des isoformes

L'objectif est de caractériser les domaines cytosoliques de l'ECE, qui sont les seuls déterminants spécifiques de chaque isoforme. Les différences de localisation de l'ECE-1 permettent notamment à cette enzyme de générer le peptide aussi bien au cours du processus sécrétoire que dans le milieu extracellulaire. Afin d'analyser le rôle spécifique de chaque isoforme, nous avons recours à des cellules transfectées. Nos modèles correspondent aux types cellulaires exprimant l'ECE-1 *in vivo* : la lignée neuroendocrine AtT-20, les cellules épithéliales MDCK et les cellules endothéliales EA.hy 926 et HMEC-1.

Nous avons pu mettre en évidence les localisations subcellulaires spécifiques de ces isoformes, et identifier certains signaux. Ce travail est poursuivi, notamment après l'identification de la quatrième isoforme (ECE-1d).

L'ECE-1 forme des dimères associés par des ponts disulfures. Nous avons déjà mis en évidence des hétérodimères entre isoformes. L'expression de ces isoformes étant régulée par des promoteurs spécifiques, nous testerons l'hypothèse selon laquelle les signaux d'adressage dominants constituent des domaines régulateurs de la localisation et de l'activité de l'ensemble des isoformes de l'ECE-1.

b) Fonction de l'ECE dans la voie d'endocytose

La dégradation par l'ECE-1, *in vitro*, de certains peptides tels que la bradykinine, l'angiotensine I, ou la neurotensine, a été décrite récemment. Cette activité présente des caractéristiques enzymatiques distinctes, notamment un pH optimum acide auquel l'ECE ne peut assurer la biosynthèse d'endothéline avec efficacité.

Nous avons mis en évidence la concentration de certaines isoformes d'ECE-1 au niveau de la voie d'endocytose, notamment dans les endosomes de recyclage. Ces structures vésiculaires au pH acide transportent les ligands de récepteurs après leur internalisation. Dans les cellules endothéliales, l'ECE est également présente dans de grosses vésicules contenant la cavéoline. Ces structures sont responsables de la transcytose des molécules provenant de la circulation. Ces résultats suggèrent la possibilité d'une nouvelle fonction de l'ECE dans la voie d'endocytose. L'ECE-1 pourrait dégrader les peptides internalisés. Afin de tester ces hypothèses, nous analyserons la capacité de l'ECE-1 de cliver la bradykinine et de modifier la réponse à ce peptide dans des cellules endothéliales et dans des cellules transfectées avec le récepteur de ce peptide (collaboration avec le laboratoire du Dr F. Alhenc-Gelas - INSERM U367).

c) Identification de protéines associées à l'ECE

La localisation des protéines membranaires est assurée par l'interaction des domaines cytosoliques avec des complexes protéiques spécifiques. Les protéines associées aux domaines cytosoliques de l'ECE régulent donc la localisation de son activité catalytique. L'identification de telles protéines pourrait permettre d'obtenir des outils peptidiques capables de moduler les activités intracellulaires et extracellulaires. Nous entreprendrons l'identification des protéines associées aux domaines cytosoliques par une approche protéomique (« interactome »). Afin de mener ce travail, nous bénéficierons des outils développés pour les études décrites ci-dessus, aussi bien au niveau cellulaire qu'au niveau moléculaire. Les complexes protéiques isolés seront analysés par électrophorèse bi-dimensionnelle suivi d'identification par spectrométrie de masse.

4. Une protéase cryptique de la fibronectine et son implication potentielle dans le modelage vasculaire

Nous avons montré que le domaine de liaison au collagène de la fibronectine (Fn) possédait une activité cryptique de type métalloprotéinase à zinc. Cette enzyme appelée fibronectine protéinase (Fn-protéinase) pourrait être impliquée dans les phénomènes de modelage et remodelage vasculaire. La Fn-protéinase est présente dans le serum de nouveau-né et est générée dans des cultures de cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV), à la suite de la cascade d'activation du plasminogène en plasmine à la surface de ces cellules. Le projet comporte un double aspect, biochimique et moléculaire.

a) Isolement et études biochimiques / enzymatiques de la Fn-protéinase

La Fn-protéinase naturelle sera purifiée à partir de serum de veau fœtal, son activité étant caractérisée par l'emploi d'une série d'inhibiteurs permettant de la différencier des métalloprotéases matricielles. La structure primaire de la protéine sera établie par maldi-tof, sa caractérisation enzymatique et biochimique sera effectuée de façon approfondie et des anticorps générés.

b) Clonage de la Fn-protéinase

À partir de fibroblastes de peau de fœtus et de cancers du sein en culture, Grey *et al.* ont isolé un facteur stimulant la migration cellulaire. Ce facteur, surexprimé dans les cancers du sein, stimule l'angiogenèse dans la membrane chorioallantoïde de poulet. Son clonage montre qu'il provient de l'épissage alternatif du gène de la fibronectine. Cet épissage alternatif mène à la synthèse d'une protéine de 70 kDa correspondant à la partie N-terminale de la fibronectine qui comprend le domaine de liaison au collagène. Notre hypothèse est que ce nouveau variant d'épissage du gène de la fibronectine soit une isoforme de la Fn-protéinase qui pourrait être surexprimée dans des conditions physiopathologiques de remodelage tissulaire.

L'ADNc de ce variant d'épissage est actuellement cloné à partir des mRNAs de cellules endothéliales. La production de la protéine recombinante et celle d'un mutant pour lequel les histidines du site catalytique de la Fn-protéinase sont remplacées par des phenylalanines sont en cours. La protéine recombinante permettra d'évaluer les effets cellulaires (prolifération, migration, apoptose) de la Fn-protéinase, d'en rechercher les mécanismes et d'étudier la régulation de son expression.

La production de la protéine recombinante facilitera la recherche de substrats et d'inhibiteurs de la Fn-protéinase (Collaboration avec le Dr V. Dive (CEA, département d'ingénierie et d'étude des protéines, Saclay). Les outils ainsi mis au point permettront d'aborder son rôle *in vitro* et *in vivo* dans l'hydrolyse de protéines de la matrice extracellulaire et donc sa contribution à la stabilisation / déstabilisation de la paroi artérielle et éventuellement à l'angiogenèse.

II — ANGIOGENÈSE EMBRYONNAIRE ET PHYSIOPATHOLOGIQUE

Équipe : A. EICHMANN, J.-M. GASC, S. GERMAIN, L. PARDANAUD, N. LAMANDÉ, C. BRÉANT, J. FAVIER, D. MOYON, L. YUAN, E. LARGER, K. SAVARY, G. SINH, S. LE JAN, V. DUBUS-BONNET, C. AMY, M.-T. MORIN, F. MONGIAT

Les trois objectifs essentiels sont : 1) l'étude de gènes impliqués dans le développement vasculaire ; 2) la découverte de nouveaux gènes induits dans l'hypoxie et l'ischémie ; 3) la validation du rôle joué par des gènes dans des modèles expérimentaux et en pathologie humaine.

Le domaine de l'angiogenèse a pris un essor considérable depuis l'identification du VEGF comme facteur majeur de croissance des cellules endothéliales (CE). D'autres molécules à effet angiogénique (zinc-métalloprotéases, facteurs de transcription, peptides vasoactifs, ...) ou anti-angiogénique (angiostatine, endostatine, serpines, ...) participent aussi au réglage délicat de la balance angiogénique / antiangiogénique qui détermine la vasculogenèse et l'angiogenèse. L'importance de ce domaine est considérable sur le plan diagnostique, pronostique et thérapeutique. Le VEGF figure en premier lieu parmi les molécules développées à effet pro- ou anti-angiogénique.

La compétition internationale est importante dans ce domaine. L'équipe a les atouts d'allier expérience et compétence dans le domaine de l'angiogenèse embryonnaire dans le modèle aviaire, de disposer d'outils moléculaires originaux et de pouvoir valider un certain nombre de cibles dans des modèles expérimentaux et en pathologie humaine. La collaboration de l'INSERM U36 avec les services cardiovasculaires de l'HEGP ainsi qu'avec l'INSERM U428 sont des atouts importants pour la validation et le transfert rapide en clinique des données expérimentales.

1. Étude de gènes impliqués dans le développement vasculaire

a) Participation des récepteurs au développement vasculaire : étude fonctionnelle au cours du développement embryonnaire

Nous avons cloné chez l'oiseau les VEGF-récepteurs VEGFR2 et VEGFR3, qui s'expriment sélectivement dans les CE de l'embryon. Le VEGFR2 s'exprime dans le mésoderme embryonnaire avant même la formation des vaisseaux sanguins et nous avons démontré que les cellules VEGFR2⁺ donnent naissance aux CE et aux cellules hématopoïétiques (CH) de différents lignages. Afin d'isoler les gènes capables de diriger le choix du lignage endothélial versus hématopoïétique de ces hémangioblastes, nous analysons le répertoire génétique de ces précurseurs en utilisant des banques différentielles d'ADNc. Leur analyse fonctionnelle sera conduite par surexpression dans un tissu dépourvu de capacité à générer des CE et des CH. Ce système, rapide et peu coûteux, peut être élargi

sur l'analyse d'un grand nombre de gènes, qui seront ensuite étudiés dans d'autres modèles, notamment chez la souris et chez l'homme.

Des études récentes ont révélé l'existence d'une variété de récepteurs et de facteurs de croissance spécifiques de l'endothélium vasculaire, y compris un nouveau récepteur au VEGF, la neuropiline-1 (NRP-1), le récepteur tie-2 et ses ligands, angiopoïétines 1 et -2 (ang-1, ang-2), les éphrines et leurs récepteurs². Nous avons mise en évidence une expression différentielle de ces couples ligands/récepteurs dans l'endothélium artériel et veineux. Le rôle précis de ces molécules dans le développement des artères, veines et vaisseaux lymphatiques n'est pas encore bien compris. Il s'agit d'une voie de recherche prometteuse pour le développement de thérapies contre des pathologies vasculaires.

Étude moléculaire des précurseurs vasculaires VEGFR2⁺ : analyse de sizzled et de la septine-2 : Parmi les gènes que nous avons isolés, nous analyserons deux molécules de signalisation susceptibles de jouer des rôles importants dans la différenciation des hémangioblastes : sizzled de poulet (c-szl) et septine-2.

Le premier gène isolé, l'équivalent aviaire du gène *sizzled* (**c-szl**), cloné récemment chez *Xenopus laevis*, fonctionne comme un antagoniste à *wnt*. Les facteurs de croissance de la famille *wnt* agissent sur la détermination cellulaire, suggérant un rôle important pour c-szl dans la différenciation des hémangioblastes. C-szl s'exprime dans les cellules mésodermiques VEGFR2⁺ de la partie postérieure de l'embryon au stade de gastrulation. Des résultats préliminaires suggèrent que c-szl a la capacité d'induire la formation de CH dans le mésoderme.

La **Septine-2** appartient à une famille de protéines localisées au niveau du plan de clivage de cellules en division et qui sont impliquées dans des divisions asymétriques. L'ARNm de la septine-2 est exprimé dans des sous-populations de CE et de CH des îlots sanguins du sac vitellin ainsi que dans des CH intra-aortiques. Des marquages immunocytochimiques des îlots sanguins du sac vitellin montrent que les CH se forment par bourgeonnement à partir des CE suggérant une division asymétrique. Un anticorps sera dirigé contre la septine-2 afin de déterminer sa localisation sub-cellulaire et de montrer si des CH sont générées à partir de divisions asymétriques de CE.

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

En utilisant le système Caille-Poulet, nous montrons que des CE circulent tout au long de la vie embryonnaire en conservant leurs capacités de différenciation et de colonisation. Nous recherchons le stade à partir duquel ces précurseurs circulent et d'où ils se ségrègent. Nous étudions également la possibilité que des

précurseurs autres que mésodermiques puissent voyager dans la circulation embryonnaire.

Étude de la différenciation de l'endothélium artériel, veineux et lymphatique :
Ce projet vise à établir le rôle de deux récepteurs transmembranaires, la neuropiline-1 (NRP-1) et la neuropiline-2 (NRP-2), au cours du développement des CE artérielles, veineuses et lymphatiques.

- **NRP-1 et différenciation artério-veineuse.** Le rôle de la NRP-1 dans le développement du réseau artériel sera étudié chez l'embryon de poulet, *in ovo*, au niveau du sac vitellin et de la membrane chorioallantoïdienne (CAM) par application de formes activant ou inhibant ce récepteur.

- **NRP-2 et développement veineux et lymphatique.** Afin de préciser le rôle de la NRP-2 au cours du développement des CE veineuses et lymphatiques, nous compléterons l'analyse spatio-temporelle de son expression et examinerons des souris dont le gène de la NRP-2 a été délété. Deux lignées de souris mutantes sont mises à notre disposition, l'analyse de leur phénotype vasculaire sera complétée par une étude biochimique de l'interaction NRP-2/VEGF-C/VEGFR3 ainsi que par croisement des souris NRP-2 déficientes avec des souris portant des mutations dans le gène du VEGFR3.

b) Participation de métallopeptidases à zinc dans l'angiogenèse embryonnaire

Nous avons montré que des peptides vasoactifs comme l'endothéline, générée à partir de son précurseur la big-endothéline par l'enzyme de conversion de l'endothéline (ECE), possédaient un effet angiogénique sur la CAM. De même, l'angiotensine II, générée à partir de son précurseur inactif par l'ACE, est angiogénique. Enfin, le groupe de R. Pasqualini a montré que l'aminopeptidase N (APN) possédait un effet angiogénique par un mécanisme encore inconnu. L'ECE, l'ACE et l'APN sont toutes des métallopeptidases à zinc pour lesquelles des inhibiteurs sont soit bien établis (ACE), soit en cours de synthèse/développement (ECE, APN). Cette recherche vise à approfondir les propriétés angiogéniques de l'ACE et de l'APN, étant donné la possibilité d'intervenir pharmacologiquement sur ces enzymes.

Rôle putatif de l'ACE dans la différenciation des premières cellules hématopoïétiques : L'implication du peptide Ac-SDKP comme substrat de l'ACE, et sa caractérisation comme peptide hémorégulateur (voir le projet « Systèmes rénine-angiotensine et endothéline ; biologie de la paroi vasculaire »), ont suscité un projet qui vise à montrer si l'ACE, par la dégradation de ce peptide, joue un rôle dans la différenciation initiale des hémangioblastes en CE d'une part, et en CH, d'autre part. Nous avons pu montrer que l'ACE est exprimée (ARNm et protéine) dans l'endoderme extra-embryonnaire de l'embryon de poulet dès le premier jour du développement. La distribution de l'ACE est compatible avec un rôle fonctionnel dans la différenciation de la première génération de CH. Une étude comparable sur l'embryon de souris est en cours et une étude fonctionnelle

in vitro (culture d'embryon) et *in vivo* dans l'œuf sera entreprise pour connaître le mécanisme par lequel cette enzyme clé du système rénine-angiotensine pourrait avoir une fonction hors de ce système.

Étude de l'expression embryonnaire de l'aminopeptidase N (APN). Recherche d'inhibiteurs à effet anti-angiogénique : Un travail sur l'effet angiogénique de l'APN a été entrepris récemment en collaboration avec le laboratoire du Pr. Bernard Roques (INSERM U266) qui nous a fourni un inhibiteur spécifique. Après avoir cloné l'APN de poulet et établi son patron d'expression spatio-temporelle par hybridation *in situ* et *in toto* (ARNm), et par des expériences de liaison sur coupe d'embryon (protéine), nous étudierons les effets *in vivo* sur la vascularisation de l'embryon et de la CAM. Ensuite, nous montrerons si un effet antiangiogénique peut être obtenu par blocage de l'APN et peut faire régresser une tumeur greffée sur la CAM. Ce modèle permettra de mieux appréhender les mécanismes d'action de l'activité angiogénique de l'APN.

Rôle du facteur de transcription EPAS-1 dans l'angiogenèse embryonnaire : Le facteur de transcription EPAS-1 (HIF-2a) fait partie de la superfamille des facteurs de transcription basic helix loop helix (bHLH). *In vitro*, il est capable de s'hétérodimériser avec son partenaire ARNT pour activer la transcription de gènes angiogéniques. L'inactivation du gène EPAS-1 chez la souris (léthale à l'état embryonnaire) conduit à des résultats discordants : dans une étude, il est noté une déficience du système nerveux sympathique tandis qu'une autre montre des lésions vasculaires.

Nous avons cloné le gène EPAS-1 chez le poulet et montré son expression importante lors de l'angiogenèse embryonnaire. Chez l'homme, nous avons aussi montré qu'EPAS-1 était précocément exprimé chez l'embryon et, par ailleurs, dans l'angiogenèse tumorale. Afin de savoir si EPAS-1 possède ou non un effet sur le modelage vasculaire, nous avons construit un rétrovirus aviaire exprimant un dominant négatif d'EPAS-1 (Favier *et al.*, en préparation). L'administration chez l'embryon de poulet de ce dominant négatif d'EPAS-1 permettra de connaître le rôle joué par ce facteur dans l'angiogenèse.

2. Nouveaux gènes induits lors de l'angiogenèse hypoxique/ischémique

L'objectif est ici la découverte de nouveaux gènes impliqués dans l'hypoxie et l'angiogenèse réactionnelle. Deux situations pathophysiologiques seront étudiées : l'ischémie critique des membres inférieurs et l'angiogenèse tumorale.

Cette étude comporte un criblage différentiel des ARNm de CE en hypoxie, inducteur d'angiogenèse, par rapport à la normoxie, par cDNA Representational Difference Analysis (cDNA RDA). 350 gènes dont l'expression est induite par l'hypoxie ont déjà été identifiés ; deux tiers correspondent à des gènes connus et un tiers à des ESTs (Expressed Sequence Tags).

a) *Angiopoietin related protein 4*

Un de ces gènes a plus particulièrement retenu notre attention : l'angiopoietin related protein 4 (ARP-4). Il s'agit d'un gène codant pour une protéine de la famille des angiopoïétines, molécules impliquées dans l'angiogenèse, particulièrement au niveau de la stabilisation et la maturation des néovaisseaux. Au niveau protéique, ARP-4 est exprimée dans le foie adulte, le tissu adipeux, le placenta et dans les glioblastomes. Son rôle dans la régulation du métabolisme lipidique a été envisagé mais aucun rôle ne lui a été attribué dans les processus angiogéniques.

Nous avons montré la surexpression de l'ARP-4 dans les tissus ischémiques (ischémie des membres inférieurs et cancer). Nous avons cloné l'ADNc entier d'ARP-4 de souris et humain et développons des anticorps. En collaboration avec le groupe de C. Monnot, nous étudions l'effet de la surexpression d'une forme recombinante d'ARP-4 dans différents modèles de cellules vasculaires. Nous étudierons les voies de signalisation des MAP-kinases, de la PI3-Kinase/Akt et de Jak/Stat et le rôle qu'ARP-4 pourrait jouer dans la régulation des phénomènes de mitogénicité et/ou d'apoptose des cellules vasculaires. Le rôle d'ARP-4 dans les processus angiogéniques sera aussi étudié en surexprimant l'ADNc d'ARP-4 de façon tissu-spécifique dans la peau et l'endothélium vasculaire : l'ADNc complet de ARP-4 de souris, sera placé sous le contrôle du promoteur du gène humain de la kératine K14 à expression cutanée. Enfin, une lignée de souris transgéniques surexprimant spécifiquement ARP-4 dans les CE sera créée sous le contrôle du promoteur de la VE-cadhérine ou de Tie-2.

b) *Neuritine*

Dans le cadre d'une étude conjointe avec le groupe d'Anne Eichmann, nous nous intéressons aussi à un autre gène : la neuritine. En effet, des études récentes indiquent l'existence de mécanismes communs de différenciation vasculaire et neuronale. La neuritine a été caractérisée dans le système nerveux et nous avons trouvé qu'elle est exprimée dans l'ischémie critique des membres inférieurs au niveau des CE vasculaires. Nous effectuerons les études d'expression de ce gène dans les phases précoces de vasculogenèse et d'angiogenèse chez l'embryon de poulet.

c) *Autres gènes*

Nous mènerons une étude systématique de l'expression de tous les gènes issus de notre criblage sur les tissus de jambes de patients atteints d'ischémie critique et les tissus tumoraux. En collaboration avec le service d'anatomie pathologique de l'Hopital Tenon, nous disposons d'un recrutement de tumeurs angiogéniques : les gènes issus du criblage cDNA-RDA seront évalués par 1) hybridation *in situ*, 2) PCR semi-quantitative ou quantitative en temps réel.

3. Validation des nouveaux gènes et études fonctionnelles

La validation des gènes explorés dans les objectifs 1 et 2 sera effectuée par l'étude de : 1) leur expression dans différents tissus normaux ou pathologiques — telle l'ischémie des membres inférieurs, 2) leur fonctionnalité dans des modèles simples (embryon de poulet) ou plus élaborés chez le mammifère.

a) *Étude de l'expression de gènes possiblement pro- ou anti-angiogéniques*

Ischémie critique des membres inférieurs : L'ischémie des membres inférieurs est une complication gravissime de l'artérite oblitérante des membres inférieurs aboutissant à l'amputation. Nous disposons, grâce au Service de Pathologie Vasculaire de l'HEGP, de prélèvements effectués lors de l'amputation en zone saine et ischémique. Nous avons étudié l'aspect des vaisseaux dans ces deux zones et semi-quantifié la densité des vaisseaux de petit et moyen calibre. Ces prélèvements permettent l'étude de l'expression de gènes possiblement impliqués dans les processus d'angiogénèse, tels ARP-4.

Parmi les molécules directement impliquées dans la formation ou le remodelage des vaisseaux, il est apparu que la thrombospondine-1 était fortement exprimée dans la partie lésée de la jambe. L'expression anormale de la thrombospondine-1, considérée comme antiangiogénique, en région ischémique, suggère que certaines molécules anti-angiogéniques pourraient être anormalement exprimées et contribuer à l'absence du développement de la néoangiogénèse.

Cellules endothéliales circulantes : Dans le cadre d'une collaboration avec le Dr M. Aiach (INSERM U428), la batterie des gènes explorés et repérés dans les objectifs 1 et 2 sera étudiée dans les CE circulantes provenant de patients sains puis souffrant d'ischémie (coronarienne ou des membres inférieurs).

b) *Étude de la fonctionnalité des gènes possiblement pro- ou anti-angiogéniques*

Modèle de l'embryon de poulet : Ce modèle a l'avantage d'être rapide, peu coûteux et permet d'analyser l'effet de gènes à divers stades de l'angiogénèse embryonnaire. Les techniques suivantes ont déjà permis d'obtenir des résultats au laboratoire : 1) application directe d'agonistes ou d'antagonistes ; 2) greffe de cellules recombinantes exprimant la protéine d'intérêt, comme dans le cas de cellules CHO produisant de l'endothéline ; 3) injection d'un rétrovirus aviaire codant pour un gène d'intérêt (un antisens) ou un dominant négatif, comme pour EPAS-1 (cf plus haut) ; 4) greffes de tumeurs sur la CAM.

Étude de l'effet du glucose sur la néovascularisation de l'embryon de poulet : Au cours du diabète, il existe une néo-vascularisation anormale. Nous proposons l'embryon de poulet comme modèle expérimental en rendant l'embryon hyperglycémique par une injection unique de glucose dans le vitellus qui est suffisante pour maintenir une concentration plasmatique élevée pendant une semaine. Une

étude macroscopique (densité vasculaire), ultrastructurale (relations entre CE et péricytes), et moléculaire (expression des facteurs de transcription et de croissance pro- ou anti-angiogéniques) montre des lésions de la paroi vasculaire à ce stade du développement embryonnaire, conséquence directe de l'hyperglycémie.

Modèles expérimentaux chez les rongeurs : Comme indiqué dans l'objectif 2 pour ARP-4, nous développerons des modèles chez la souris ou le rat pour l'étude des fonctions pro- ou anti-angiogénique des molécules des précédents objectifs et des modèles d'ischémie cardiaque et rénale tel que l'ischémie-reperfusion dans le cœur de lapin (collaboration avec l'EPI 01 INSERM, Dr A. Berdeaux).

Étant donné l'intérêt potentiel des molécules anti-angiogéniques dans le cancer, des collaborations sont déjà en cours avec l'IGR (Dr M. Pericaudet, Dr J. Feunten) pour l'étude de l'effet anti-tumoral putatif de l'angiotensinogène, molécule anti-angiogénique découverte et brevetée au laboratoire (Brevet européen n° 0 1401077.1).

III — NEUROPEPTIDES CENTRAUX ET RÉGULATION HYDRIQUE ET CARDIOVASCULAIRE

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

Le but de nos travaux est d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques. La démarche consiste à étudier l'organisation et le rôle fonctionnel d'un système peptidergique donné. Ces études permettent d'identifier les enzymes impliquées dans le métabolisme de ces peptides et les différents sous-types de récepteurs sur lesquels ces peptides agissent. La synthèse de molécules bloquant ces nouvelles cibles et leur évaluation *in vivo* sur les différentes actions biologiques induites par ces peptides conduisent au développement de composés potentiellement utilisables en clinique.

1. Étude du Système Rénine-Angiotensine (SRA) Cérébral

Au cours de ces dernières années, nos travaux ont été principalement axés sur l'organisation et le rôle fonctionnel du SRA cérébral. Nous avons montré dans le cerveau que l'aminopeptidase A (APA) et l'aminopeptidase N (APN), deux ectoenzymes à zinc, étaient respectivement impliquées, *in vivo*, dans la conversion de l'angiotensine II (AngII) en angiotensine III (AngIII) et dans l'inactivation de l'AngIII en angiotensine IV. Une exploration systématique du site actif de l'APA par mutagénèse dirigée et par le criblage de banques de pseudo-peptides réalisées par chimie combinatoire a permis la synthèse d'inhibiteurs spécifiques et sélectifs de l'APA, inexistant jusqu'à ce jour, tel un pseudotripeptide β -aminothiols (travaux conjoints entre INSERM U266, équipe de MC. Fournié-

Zaluski et notre équipe ; Brevet PCT/FR00/00112). En bloquant *in vivo* l'APA et l'APN par des inhibiteurs spécifiques et sélectifs, nous avons montré que le peptide effecteur du SRA cérébral était l'AngIII et non l'AngII comme établi à la périphérie. Ces travaux ont mis en évidence que l'AngIII cérébrale exerce un effet stimulateur tonique dans le contrôle central de la pression artérielle (PA) chez le rat hypertendu vigile. Ainsi, l'injection centrale et non systémique des inhibiteurs de l'APA, diminue la PA chez le rat spontanément hypertendu (SHR) vigile, un modèle de l'hypertension essentielle humaine. Ces résultats suggèrent que l'APA cérébrale pourrait constituer une nouvelle cible thérapeutique pour le traitement de l'hypertension artérielle (HTA) et justifie le développement d'inhibiteurs spécifiques et sélectifs de l'APA, capables de traverser la barrière hémato-encéphalique comme antihypertenseurs à action centrale (Brevet PCT/FR9900059).

Notre projet consiste à effectuer une étude structure fonction de l'APA, afin de synthétiser des inhibiteurs spécifiques et sélectifs de cette enzyme, capables de passer la barrière hématoencéphalique. Ces molécules seront ensuite évaluées *in vivo* après injection par voie intraveineuse ou orale, dans différents modèles d'HTA expérimentale.

a) *Étude structure-fonction de l'aminopeptidase A. Construction d'un modèle 3D de l'APA*

La récente résolution de la structure cristallographique de la leukotriène A4 (LTA4) hydrolase représente la première structure 3D d'une aminopeptidase monozinc. La structure du site actif de la LTA4 hydrolase est en accord avec le rôle des résidus que nous avons caractérisé dans l'APA et le mécanisme catalytique que nous avons proposé. Cette similitude va nous permettre d'établir un modèle 3D du site actif de l'APA sur la base de la structure cristallographique de la LTA4 hydrolase en collaboration avec le Dr B. Maigret (UMR, CNRS 7565, Lab. de Chimie théorique). Nous allons effectuer une modélisation par homologie de la chaîne protéique comprise entre les résidus 50 et 539 de l'APA. Cette région présente la plus forte conservation de séquence avec la LTA4h. Ce modèle préliminaire sera amélioré par optimisation de son énergie conformationnelle. L'atome de zinc puis l'inhibiteur GluPO_3H_2 (analogue de l'état de transition) seront ajoutés à ce modèle ainsi qu'une couche de molécules d'eau afin de tenir compte d'un effet éventuel du solvant. Ce modèle sera ensuite optimisé par minimisation d'énergie et par dynamique moléculaire. Nous avons récemment obtenu un modèle 3D préliminaire de l'APA très proche de la structure la LTA4 hydrolase permettant de visualiser de nouveaux résidus, qui semblent importants pour la structure de l'enzyme ou son activité (liaison du substrat, liaison du calcium).

En combinant ces données structurales à celles que nous obtiendrons par mutagenèse dirigée, nous pourrions établir le rôle exact de ces résidus et valider notre

modèle. Chaque protéine mutée sera exprimée de façon stable en cellules CHO puis purifiée et caractérisée sur le plan biochimique et enzymatique. Ce modèle permettra de définir un pharmacophore d'inhibiteur de l'APA utile pour la synthèse de nouvelles molécules.

b) Production de l'aminopeptidase A pour la cristallisation

La cristallisation de l'APA finalisera la caractérisation structurale de l'enzyme. Afin de produire l'APA en grande quantité, un système d'expression en cellules d'insectes sera utilisé. Une forme soluble sera générée en sous-clonant le domaine extracellulaire de l'APA dans un vecteur d'insecte de nouvelle génération, possédant un signal de sécrétion (HBM), comme dans le cas de l'endopeptidase neutre EC 3.4.24.11.

c) Développement et étude d'inhibiteurs spécifiques et sélectifs de l'aminopeptidase A

Au sein d'un partenariat avec les laboratoires Glaxo-Wellcome et l'équipe de M-C Fournié-Zaluski, nous développerons de nouveaux inhibiteurs spécifiques et sélectifs de l'APA capables de passer la barrière hématoencéphalique après injection parentérale. L'activité de ces molécules sera évaluée en étudiant leur capacité à bloquer l'activité APA cérébrale, à bloquer la conversion de l'AngII en AngIII dans le SNC, à abaisser la PA dans l'HTA expérimentale.

Les expériences en traitement aigu puis semi-chronique (8 jours) par voie iv ou orale seront conduites dans deux modèles d'HTA expérimentale : 1) Le rat SHR, 2) le rat DOCA-sel. Ce dernier modèle se caractérise par une inefficacité des inhibiteurs du SRA systémique et par une rénine basse, données retrouvées dans l'HTA des sujets noirs américains. Ce modèle est intéressant car le SRA périphérique n'est pas impliqué dans l'élévation de la PA. Ces études permettront de savoir si un inhibiteur de l'APA pourrait avoir un effet anti-HTA, du fait de l'inhibition du SRA central.

Sur ce thème, depuis 1998, 3 étudiants ont soutenu leur thèse et un quatrième son DEA.

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

Nous avons récemment étudié la distribution des ARN_{ms} des récepteurs AT_{1A} et AT_{1B}, les deux isoformes des récepteurs AT₁ de l'angiotensine chez les rongeurs, le long du néphron de rat par RT-PCR. Les différents segments expriment majoritairement les ARN_{ms} du récepteur AT_{1A}, à l'exception du glomérule où les ARN_{ms} des deux isoformes sont exprimés en quantité similaire. La stimulation de AT_{1A} et AT_{1B} par l'Ang II/III active la mobilisation du calcium intracellulaire avec la même efficacité. Nous nous sommes plus particulièrement intéressés à

la branche large ascendante corticale (CTAL) qui exprime presque exclusivement les ARN_{ms} du récepteur AT_{1A}. Nous avons mis en évidence dans ce segment que l'AngII/III, via AT_{1A}, médie des augmentations de calcium intracellulaire dépendantes de l'activité de plusieurs enzymes telles que la tyrosine kinase, la protéine kinase C (PKC), mais aussi la phosphatidyl 3-kinase qui induit une régulation concertée de la Na⁺-K⁺-ATPase et du cotransporteur Na⁺-K⁺-2Cl⁻ via la PKC. Bien que le CTAL ne contienne qu'un seul type cellulaire, il est soumis à de multiples régulations hormonales impliquant entre autres une action de la vasopressine (via le récepteur V₂) et de la bradykinine (via le récepteur B₂).

Projet : Il a été montré que les récepteurs AT₁ et B₂ sont capables de s'hétérodimériser. Dans le CTAL, l'AngII/III stimule le transport de sodium, alors que la bradykinine l'inhibe. Le CTAL est donc un modèle « *ex vivo* » qui nous permettra d'approfondir ce type de régulation, notamment en regardant si différentes isoformes de PKC sont impliquées au cours de la stimulation par l'AngII/III ou la bradykinine.

3. Recherche de ligands endogènes de récepteurs orphelins présents dans le SNC

Au cours des travaux que nous avons réalisés sur la distribution cérébrale et l'identification du type cellulaire exprimant les récepteurs de l'AngII/AngIII, l'existence d'un autre sous-type de récepteur des angiotensines, spécifique de l'AngIII a peu à peu émergé. En partant d'ARN total de noyaux supraoptiques de rat, nous avons isolé un récepteur à 7 domaines transmembranaires couplé aux protéines G (GPCR) partageant 31 % d'identité de séquence avec le récepteur AT_{1A}. Nous avons étiqueté ce récepteur avec l'EGFP et nous l'avons exprimé dans une lignée stable CHO. Ce récepteur est présent à la membrane mais ne lie pas les angiotensines l'identifiant à un récepteur orphelin. Ceci nous a conduit à développer un nouveau procédé de criblage pour l'identification de ligands endogènes de récepteurs orphelins mettant à profit la propriété qu'ont les GPCRs à s'internaliser sous l'action de ligands agonistes. Cette méthode consiste à 1) étiqueter un récepteur orphelin avec la protéine autofluorescente EGFP et l'exprimer à la surface de cellules eucaryotes ; 2) mettre ces cellules en contact avec des fractions HPLC purifiées d'un extrait tissulaire ; 3) visualiser en microscopie confocale l'internalisation du récepteur fluorescent. En effectuant plusieurs étapes de purification et de tests d'internalisation successifs, il est possible d'isoler et de purifier la fraction contenant le ligand peptidique pur et de séquencer celui-ci. (Brevet PCT/FR 00/00113 en coll. avec A. Beaudet, Montréal Inst. McGill et H. Vaudry, INSERM U413, Contrat de licence avec la Société Neuro 3D N° 98210B10). Nous avons validé ce procédé sur le récepteur de la neurotensine.

Notre projet de recherche consiste à appliquer ce procédé à la recherche de ligands endogènes de GPCRs orphelins (4 récepteurs orphelins sont actuellement à l'étude), localisés dans le SNC et présentant une similarité de séquence avec

des récepteurs de neuropeptides déjà connus. Ce travail fait l'objet d'une Alliance avec l'unité Inserm U413 et l'Institut de Recherche SERVIER.

4. Étude d'un nouveau neuropeptide, l'apéline et de son récepteur

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

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

Nous avons montré récemment que ce peptide est présent dans le cerveau humain et murin et qu'il intervient dans la régulation du métabolisme hydrosodé et des fonctions cardiovasculaires. De plus, le récepteur de l'apéline a été identifié comme étant un corécepteur pour l'entrée du virus du SIDA et certains fragments d'apéline pourraient bloquer l'entrée de ce virus. Vu les fonctions de ce récepteur, il devient important de développer de façon rationnelle des agonistes ou antagonistes de ce récepteur, qui permettront aussi d'approfondir le rôle physiologique de l'apéline.

a) *Études structure-fonction du récepteur de l'apéline*

Relation entre la structure et l'activité de différents ligands peptidiques sur le récepteur de l'apéline : Nous comparerons la capacité de différents fragments d'apéline à se lier sur le récepteur de l'apéline, à modifier la production d'AMPc (second messenger du récepteur de l'apéline) et à induire l'internalisation de ce récepteur. Ceci permettra de définir la séquence minimale de la molécule capable de se fixer sur le récepteur et d'induire son activation, premiers pas vers la synthèse d'un analogue non dégradable ou d'un antagoniste de ce récepteur (coll. avec le laboratoire d'H. Vaudry, INSERM U413). Le test (liaison sur le récepteur de l'apéline) se fera à partir d'une chimiothèque de 2 000 composés et sera effectué en collaboration avec la Société Neuro 3D.

Modélisation du récepteur de l'apéline et validation du modèle par des études structure-fonction par mutagenèse dirigée : Le récepteur de l'apéline est un GPCR qui n'a pas encore été étudié sur le plan structural. Une caractérisation pharmacologique du récepteur murin a été entreprise dans notre équipe et révèle qu'il y aurait une dissociation entre l'internalisation et le couplage transductionnel du récepteur. En effet, des délétions à l'extrémité N- ou C-terminale de K17F ont montré que la partie C-terminale du peptide semble être cruciale pour l'internalisation alors qu'elle ne semble pas avoir d'incidence sur la transduction du signal du récepteur de l'apéline. Il semble que la séquence peptidique (ou la structure du peptide) soit importante et que les sites d'ancrage du peptide dans le récepteur

induisant l'internalisation ou le couplage transductionnel soient distincts. Le projet de recherche consistera à construire un modèle 3D du récepteur de l'apéline par homologie en se basant dans un premier temps sur la structure 3D du récepteur de la rhodopsine. Ce modèle sera ensuite amélioré en le comparant à celui du récepteur de l'angiotensine II de type-1 (AT1) qui partage une forte identité de séquence avec le récepteur de l'apéline⁵. La validation et l'amélioration du modèle aideront au développement d'agonistes/antagonistes qui permettront une caractérisation fine du rôle physiologique et physiopathologique de ce récepteur.

b) Identification du fragment d'apéline produit in vivo : Développement d'un dosage RIA de l'apéline et analyse de l'immunoréactivité de l'apéline cérébrale

Afin de caractériser l'anticorps dirigé contre K17F que nous avons produit, un dosage RIA a été développé. Les premiers résultats montrent que l'affinité de l'anticorps pour K17F est comprise entre 10^{-10} M et 10^{-9} M. Actuellement, des expériences complémentaires sont en cours afin d'estimer le degré de sélectivité de cet anticorps vis à vis de différents fragments d'apéline. L'immunoréactivité apéline dans différentes régions du cerveau de rat sera étudiée et la nature de l'immunoréactivité mesurée sera identifiée par HPLC, dosage RIA et identification du peptide isolé par spectrométrie de masse (coll. INSERM U413).

c) Rôle physiologique de l'apéline

Distribution de l'apéline et de son récepteur dans le SNC : Dans le cerveau humain, il n'existe que des études succinctes d'hybridation *in situ* de l'ARNm de la préproapéline et d'immunocytochimie du récepteur de l'apéline. Après avoir réalisé la distribution détaillée des neurones apélinergiques et du récepteur de l'apéline dans le cerveau de rat adulte, nous entreprendrons la distribution de l'apéline et de son récepteur dans le cerveau humain de sujets sains. Nous envisageons par la suite, en fonction des données obtenues et des moyens disponibles, d'étudier cette distribution sur des cerveaux de personnes décédées et atteintes par le virus du SIDA afin d'évaluer si les régions lésées sont celles qui expriment les récepteurs ou les neurones apélinergiques.

Rôle de l'apéline dans le contrôle de la PA : L'apéline et son récepteur sont présents dans les mêmes structures que celles qui expriment l'angiotensine II/III, ce qui suggère que l'apéline pourrait être impliquée dans le contrôle de la PA. Pour vérifier cette hypothèse, nous évaluerons l'expression de l'apéline dans le cerveau d'animaux hypertendus et les effets centraux de différents fragments d'apéline sur la PA dans différents modèles d'HTA chez l'animal vigile.

Recherche d'une implication de l'apéline dans la prise alimentaire : Les corps cellulaires des neurones apélinergiques sont présents dans le noyau arqué et semblent situés à la même antériorité que les corps cellulaires des neurones à

neuropeptide Y (NPY), neuropeptide stimulant la prise alimentaire. De nombreuses fibres apélinergiques sont aussi présentes dans les noyaux dorso- et ventromédian, suggérant aussi que l'apéline pourrait jouer un rôle dans la prise alimentaire.

Nous évaluerons tout d'abord l'expression de l'apéline dans ces structures chez des rats Wistar Kyoto soumis à une restriction alimentaire ou chez des rats Zucker génétiquement obèses. Puis, nous rechercherons si l'apéline est colocalisée avec le NPY par des expériences de double marquage et nous étudierons *in vivo* l'effet de l'apéline injectée par voie icv sur la prise de nourriture chez le rat ou la souris ayant subi ou non une restriction alimentaire. Ces résultats seront comparés à ceux obtenus parallèlement après injection i.c.v. du NPY.

Recherche d'une implication de l'apéline dans la régulation des rythmes circadiens : L'ARNm du récepteur de l'apéline est exprimé dans la glande pinéale, le noyau para-ventriculaire (PVN) et le noyau suprachiasmatique. Les neurones apélinergiques sont présents dans le noyau suprachiasmatique, l'aire retrochiasmatique et le PVN, structures jouant un rôle important dans la régulation des rythmes circadiens, suggérant que l'apéline pourrait être impliquée, comme la mélatonine, dans cette régulation. L'expression de l'apéline sera évaluée dans plusieurs structures (glande pinéale, hypothalamus, hypophyse) au cours des périodes jour et nuit. Une éventuelle colocalisation de l'apéline avec des neuropeptides impliqués dans la régulation des rythmes circadiens comme le NPY, le VIP, la vasopressine sera recherchée.

En collaboration avec le laboratoire du Prof P. Pevet (UMR 7518 CNRS) et plus particulièrement avec l'équipe du Dr V. Simmoneaux, l'effet de l'apéline sur la sécrétion de mélatonine sur des pinéaloctes en culture primaire sera étudié. Parallèlement nous déterminerons si ces cellules expriment l'apéline ou son récepteur par des expériences de dosage RIA, de liaison ou de RT-PCR.

Puis, *in vivo*, chez la souris, l'effet central de l'apéline sur l'activité locomotrice en périodes jour et nuit et nuit après un flash lumineux sera étudié, sachant qu'il a été démontré que l'activité locomotrice de différents rongeurs est le reflet d'une libération circadienne de mélatonine (Collaboration avec le Dr E. Challet, UMR 7518 CNRS).

Recherche d'une implication de l'apéline dans la régulation de la sécrétion d'ACTH : La détection de l'apéline et de son récepteur dans la partie parvocellulaire du PVN et dans les cellules du lobe antérieur de l'hypophyse (données personnelles) suggèrent une éventuelle régulation de la sécrétion d'ACTH par l'apéline soit au niveau hypothalamique via le CRF, soit au niveau hypophysaire par un effet direct. Nous rechercherons si le récepteur de l'apéline est présent dans les neurones à CRF. Enfin, nous étudierons l'effet de l'apéline sur la libération de CRF dans l'éminence médiane et une éventuelle colocalisation de l'apéline ou de son récepteur avec l'ACTH. Si ces résultats s'avèrent positifs, nous effectuerons des expériences *ex vivo* consistant à superfuser des antéhyppo-

physes de rat en présence ou en absence d'apéline et à mesurer l'ACTH libérée dans les superfusats (Collaboration avec l'équipe du Dr Bluet-Pajot, INSERM U549).

Conséquences prévisibles pour l'évolution des connaissances dans le domaine médical ou en santé publique :

- L'APA pourrait constituer une nouvelle cible thérapeutique pour le traitement de l'HTA pour laquelle peu de nouveaux médicaments sont disponibles, alors même que certaines formes d'HTA (notamment chez le sujet noir Américain) sont difficiles à équilibrer.
- L'intérêt d'avoir développé un nouveau procédé de criblage pour la recherche de ligands endogènes de GPCRs orphelins localisés dans le SNC est de découvrir de nouveaux neuropeptides comme l'apéline, puis de comprendre leurs rôles physiopathologiques. En fonction des données obtenues, le récepteur orphelin étudié deviendra une cible thérapeutique potentielle justifiant le développement d'agonistes ou d'antagonistes non peptidiques comme composés potentiellement utilisables en clinique.

IV — GÉNÉTIQUE ET CLINIQUE DE L'HYPERTENSION ARTÉRIELLE

Équipe : X. JEUNEMAITRE, G. BEURAIN, A.-M. HOUOT, C. DELALOY, F. MEUNIER, K. BARAT, J. LU, A.P. GIMENEZ-ROQUEPLO

L'hypertension artérielle (HTA) représente l'exemple même d'une maladie complexe, soumise à de multiples facteurs génétiques et environnementaux divers. Une des particularités des approches que nous mettons en œuvre est la complémentarité entre les équipes clinique et génétique de l'HEGP et celles travaillant au sein de l'Unité 36. Nous avons pu, au cours des 4 dernières années, poursuivre notre effort de collection de familles avec HTA essentielle et secondaire, de collection de tumeurs de la surrénale, de même que focaliser une partie de nos études sur des formes rares héréditaires d'HTA. Nous avons effectué les études fonctionnelles de plusieurs variants génétiques humains de l'angiotensinogène, démontré un certain nombre de relations génotypes-phénotypes originales dans l'HTA essentielle, et surtout identifié deux gènes inattendus, appartenant à une nouvelle famille de kinases, WNK1 et WNK4, comme responsables d'une forme particulière d'HTA. Une grande partie des projets de l'équipe est maintenant tournée vers l'étude de la régulation de l'expression de ces gènes *in vitro* et *in vivo*, la création de modèles animaux transgéniques, la recherche de partenaires. Pour ces différents projets, notre équipe a développé des collaborations nationales, européennes et internationales, a accueilli au cours des quatre dernières années 3 étudiants en stage de maîtrise, 2 étudiants en DEA, 3 chercheurs post-doctorants, et soutenu une thèse de Génétique. Nous avons intégré en 2002 un chercheur CR1 Claude Bernard, et espérons la nomination d'un chercheur

post-doctoral en CR2. Au niveau du Département de Génétique, le Dr Anne-Paule Gimenez-Roqueplo qui devrait être promue MCU-PH en 2002, a obtenu un Contrat Objectif INSERM, ce qui lui permettra d'augmenter son temps recherche au sein de l'Unité. L'accueil d'un nouveau chercheur post-doctorant est prévu au cours de l'année 2002, de même que le prolongement d'un étudiant de DEA en thèse et l'accueil d'un étudiant en DEA supplémentaire.

1. Rôle d'une nouvelle famille de kinases, WNKs

a) Analyse d'une forme autosomique dominante d'hypertension artérielle essentielle avec hyperkaliémie

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

Nous avons caractérisé plusieurs familles françaises, confirmé la transmission autosomique dominante de la maladie, montré les liens entre les anomalies métaboliques (hyperkaliémie, hyperchlorémie, acidose métabolique) mais l'apparition plus tardive de l'hypertension artérielle et identifié un nouveau locus appelé PHA2-C (chr 12p13) à partir d'une grande famille originaire du Nord de la France. Nous avons pu collecter plus de 20 familles et montré une grande variabilité intrafamiliale mais aussi interfamiliale du phénotype. Parallèlement à ce travail, nous avons poursuivi l'analyse moléculaire du locus PHA2-C par analyse de cartographie physique et génétique. En collaboration avec le laboratoire de RP Lifton (Yale, USA), également sur l'étude du même locus à partir d'une seule famille atteinte, nous avons finalement identifié une délétion de 22 Kbp dans l'intron 1 du gène d'une kinase, WNK1, délétion incluse dans la délétion de 41 Kbp retrouvée dans la famille américaine, et dont nous avons pu montrer qu'elle entraînait une surexpression du gène. Parallèlement, l'identification d'homologues de cette kinase, WNK4 au locus PHA2B (chr 17q21), a montré la présence d'autres mutations faux-sens chez d'autres familles atteintes. Ces deux gènes, *WNK1* et *WNK4*, codent une nouvelle famille de sérine/thréonine kinases (*with no lysine (K) kinase*), famille récemment isolée et donc très peu caractérisée. Les kinases codées par ces gènes sont particulières : la lysine catalytique dans le sous-domaine II du domaine kinase est en effet remplacée par une

cystéine. Elles ne semblent pas activer les voies classiques des MAP kinases et leur capacité d'autophosphorylation est influencée par les modifications de concentration ionique extracellulaire : elles pourraient donc être impliquées dans des mécanismes de régulation osmotique de la cellule et donc intervenir dans une voie de régulation de transporteurs ioniques. Cependant, l'expression ubiquitaire de WNK1 suggère un rôle physiopathologique plus large.

Étude de la régulation de l'expression de WNK1 et WNK4 (C. Delalay, DEA puis Thèse, J. Lu Poste vert INSERM, A.-M. Houot Assistant Ingénieur Inserm) : Le gène WNK1 est étendu sur plus de 150 kbp, comprend 28 exons et est à l'origine de deux transcrits d'environ 9,5 et 11 kb. L'expression de ces 2 isoformes est tissu-spécifique. Le transcrit long de WNK1 est préférentiellement exprimé dans le cœur, le muscle squelettique, le testicule et le cerveau, alors que le transcrit court est très largement majoritaire dans le rein, ceci de façon identique chez l'homme et la souris. À partir de l'analyse de leucocytes circulants, il a pu être montré que seule la forme courte est surexprimée — 5 à 10 fois — chez les patients, suggérant que l'isoforme courte rénale serait à l'origine de la pathologie. Ceci implique l'existence d'une répression constitutive et spécifique de l'expression de la forme courte par des éléments contenus dans les séquences délétées de l'intron 1. L'objectif est l'étude *in vitro* des promoteurs de WNK1 sous contrôle transcriptionnel de différentes séquences pouvant correspondre aux promoteurs possibles. Une fois les promoteurs ubiquitaire et rénal déterminés, la séquence correspondant à la délétion dans l'intron1 de 22 kb sera clonée, transfectée, analysée en tests Luciférase et vérifiée par western-blot et des expériences d'empreinte à la DNase et de retard sur gel seront effectuées à partir d'extraits protéiques cellulaires exprimant les deux isoformes. Ces études *in vitro* constituent un préalable indispensable aux études *in vivo* présentées ci-dessous.

Ces études seront complétées par l'analyse de l'expression des gènes WNK1 et WNK4 au cours du développement chez la souris (Coll. J.-M. Gasc dans le laboratoire). En raison de l'expression ubiquitaire de WNK1 et de l'expression spécifiquement rénale de WNK4, l'objectif de ce travail est 1) de comparer la localisation rénale (souris, rat, homme) de ces deux kinases, 2) d'analyser leur expression au cours du développement chez l'embryon de souris et de rat, 3) d'analyser l'expression de WNK1 au cours du développement normal dans les autres tissus exprimant cette kinase à l'état adulte (en particulier, cœur, muscle, cerveau), 4) d'analyser cette expression dans différentes situations pathologiques, en particulier souris K.O. pour le gène NCC (co-transport NaCl) qui devrait être une cible au moins indirecte de ces enzymes. Un certain nombre d'outils ont été développés au cours de l'année 2001 dans le laboratoire : clonage des cDNA humains des 2 isoformes présumées de WNK1, de WNK4, clonage de sondes 5' et 3' pour hybridation *in situ*, synthèse d'anticorps polyclonaux correspondants à des antipeptides choisis dans les parties N et C-terminales des 2 protéines.

Recherche de partenaires de WNK1 et WNK4 (I. Desitter, CDD recherche ; post-doc) : Une des caractéristiques essentielles de WNK1 et WNK4 est la présence de deux domaines coiled-coil, après le domaine kinase et dans la partie C-terminale de la protéine. Ces domaines jouent probablement un rôle important dans la liaison de la kinase à des protéines partenaires qui seront recherchées par la stratégie de double-hybride en levure. La première partie de ce projet est effectué en collaboration avec l'équipe de O. Staub (Institut de Pharmacologie, Lausanne, Pr B. Rossier). Les recherches de partenaires seront conduites initialement avec l'aide d'une banque de cDNA de souris. Des résultats préliminaires encourageants ont déjà été obtenus, suggérant un ou deux partenaires.

Création de modèles souris (J. Hadchouel, post-doc ; C. Delaloy ; Coll. U367, P. Meneton) : La création d'animaux génétiquement modifiés constitue l'outil indispensable d'analyse moderne de la fonction de ces gènes. Pour WNK1, où l'anomalie humaine semble être un gain de fonction liée à une surexpression génique, nous réaliserons deux constructions permettant la réalisation par transgénèse classique d'un modèle animal souris surexprimant l'une ou l'autre des isoformes WNK1 dans le tubule distal du néphron. Les cDNA humains formes « longue » et « courte » sont déjà clonés au laboratoire et leur expression ciblée dans le tubule distal par clonage du promoteur KSP-cadherin — dont l'expression a déjà été démontrée comme spécifique du tubule rénal en amont du cDNA. Avec J. Hadchouel, nous étudierons la possibilité d'analyse in vivo de la régulation de WNK1 chez l'animal entier, avec dans un premier temps l'utilisation de la technologie des BACs (pour disposer de grands fragments d'ADN en amont du gène) et du gène rapporteur nLacZ, marqueur sensible et résolutif. Plusieurs constructions seront utilisées pour reproduire la séquence répresseur de l'intron 1, dont le profil d'expression sera étudié au cours du développement et dans le tissu adulte. Le modèle souris de PHA2 lié à la surexpression de WNK1 sera ensuite créé chez la souris par délétion du ou des élément(s) répresseur(s) identifié(s) dans le génome des cellules ES, injection des cellules ES dans les blastocystes et établissement de lignées murines (collaboration avec F. Tronche, Collège de France).

La recherche d'un modèle animal permettant de préciser le rôle de WNK4 sera aussi effectuée en collaboration avec P. Meneton (U367 INSERM) qui possède cette expertise. WNK4 est exprimé essentiellement dans le rein (tubes distal et collecteur) et sous une seule isoforme de 4.4 Kb. Nous avons choisi la création de souris K.O. et une lignée de souris K.I. reproduisant les mutations humaines — délétion de la séquence en aval du 2 domaine coiled-coil. Cette étude a obtenu un financement dans le cadre du programme ACI 2001.

L'ensemble de ces projets de transgénèse, devrait permettre d'obtenir un modèle de la pathologie humaine, de corrélérer le niveau d'expression à la sévérité du phénotype, d'apporter des éléments de réponse concernant le rôle de la spécificité tissulaire des deux isoformes de WNK1, et de caractériser les importances

relatives de WNK4 et WNK1 dans la régulation du transport ionique et de la pression artérielle et éventuellement de tester l'interaction entre ces 2 gènes.

Identification d'autres gènes responsables du PHA2 (G. Beaurain CR1 Cl. Bernard, F. Mathieu Post-doc, B. Fiquet-Kempf, médecin) : La collection de familles supplémentaires nous a permis de tester la liaison entre les sujets atteints de trois familles et d'exclure les trois loci candidats déjà connus. Nous avons ainsi montré que le PHA2 faisait intervenir au moins un quatrième locus. Nous poursuivrons la caractérisation de plusieurs familles et localiserons le nouveau locus responsable de la maladie. Avec les 4 familles les plus informatives actuellement à notre disposition, une simulation d'étude de liaison montre que les LOD scores maxima attendus sont entre 1.5 et 3.6 pour chacune des familles et un total >7.0 en cas d'homogénéité génétique. Une analyse de génome entier semble être la plus appropriée à notre objectif, et sera conduite en collaboration avec le Centre National de Génotypage.

2. Hypertension artérielle essentielle :

Analyse de gènes candidats et relations génotypes-phénotypes

a) Collection de familles, analyse de gènes candidats (Dépt de Génétique, Service d'HTA, CIC, HEGP)

L'analyse génétique de l'HTA essentielle nécessite de grandes collections d'individus et de familles afin de pouvoir tester l'hypothèse d'effets faibles ou interactifs de gènes de susceptibilité. Nous poursuivrons notre effort unique en France de collection et de caractérisation de familles hypertendues (>800 à ce jour). Un effort particulier est effectué pour le recrutement de fratries concordantes et discordantes pour la pression artérielle, avec la participation d'un financement industriel (BMS 2001-3). Un effort est aussi effectué pour le recrutement et la caractérisation clinique et biologique de trios (2 parents, 1 sujet index) dans le cadre d'un contrat CEE du 5^e PCRDT 2001-3 (Investigateur principal, Pr A. Dominiczak, Glasgow). Pour cette dernière étude, l'analyse génotypique est effectuée au Centre National de Génotypage (Pr M. Lathrop, Évry), après une phase initiale de recherche systématique de polymorphismes sur gènes candidats.

Nous poursuivrons également la collaboration entretenue depuis 1994 avec l'équipe du Pr G.H. Williams (Boston, USA) et des Dr S.C. Hunt et P.N. Hopkins (Salt Lake City, USA) pour l'étude phénotypique détaillée de paires de fratries hypertendues avec pour objectif l'étude de relations entre polymorphismes de gènes candidats et des phénotypes intermédiaires impliqués dans la régulation de la pression artérielle (système rénine angiotensine, système kallitréine-kinine, réponse au sel, sécrétion d'aldostérone, contre-transport Na/Li). Dans le cadre de cette collaboration, plus de 400 individus sur les 3 sites ont maintenant été étudiés. Nous avons pu montrer des relations familiales positives sur la concentration plasmatique de rénine dans des conditions standardisées de régime salé ainsi

que sur la réponse de la sécrétion d'aldostérone à la perfusion d'angiotensine II (phénotype de modulation-non modulation), et de l'excrétion de cortisol urinaire. Le polymorphisme M235T du gène de l'AGT est significativement associé au phénotype de non-modulation. Des relations fortes ont été retrouvées entre la concentration plasmatique de LDL-cholesterol et la réponse tensionnelle à l'administration aiguë d'angiotensine II, qui pourrait être en partie médiée par le gène du récepteur de type 1 de l'angiotensine II. Une association significative a été retrouvée entre gène de l'adducine, contre-transport Na/Li et profil plasmatique de rénine.

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

b) Études des gènes WNK1 et WNK4 dans l'HTA essentielle (K. Barat, CDD, J. Lu, Poste Vert INSERM)

La découverte des gènes WNK1 et WNK4 à l'origine du PHA2. Nous recherchons les SNPs de ces gènes et leur association dans l'HTA essentielle, notamment dans des études européennes, en particulier l'étude BRIGHT dirigée par le Pr M. Caulfield (Londres, UK) et contenant plus de 1 500 fratries hypertendues.

c) Analyse de relations génotypes-phénotypes (F. Mathieu, Post-doc ; Dépt de Génétique et CIC, HEGP)

Deux études originales ont débuté à partir des résultats obtenus au cours des dernières années. La première est une étude de pharmacogénétique effectuée chez des fratries hypertendues avec l'objectif de déterminer les déterminants de la réponse aiguë et chronique au candésartan, inhibiteur des récepteurs de l'angiotensine II. Cette étude, effectuée au CIC de l'HEGP, a prévu d'inclure 30 fratries hypertendues (60 sujets) avec des mesures répétées cliniques et biologiques et permettra l'analyse des éventuelles relations génotypes — réponse médicamenteuse.

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

La poursuite de cette recherche tant au niveau génétique, biochimique et clinique a obtenu un financement du programme ACI en 2000 (F. Alhenc-Gelas, Investigateur principal).

3. Étude clinique et génétique de formes secondaires d'hypertension artérielle

a) Phéochromocytomes et Hyperaldostéronismes primaires (Dr A.P. Gimenez-Roqueplo, Dr B. Fiquet-Kempf, Pr P.-F. Plouin)

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

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

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

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

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

Pour la dysplasie fibromusculaire (DFM), artériopathie systémique d'origine inconnue, touchant les artères musculaires de moyen calibre en particulier les atteintes rénales et cérébrales, nous avons effectué depuis 1995-6 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. Nous poursuivons l'analyse phénotypique de l'atteinte vasculaire — des résultats prometteurs ont été obtenus par échographie de haute résolution en collaboration avec l'unité 337 (S. Laurent ; Projet financé par la Sté Française d'Hypertension Artérielle, promotion INSERM).

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

LISTE DE PUBLICATIONS DU LABORATOIRE 2001-2002

2001

KEMPF H. and CORVOL P. Angiotensin receptor(s) in fowl. *Comp. Biochem. Physiol.* 128 : 77-88, 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., BRUNEVAL 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.

MISEREY-LENKEI S., LENKEI Z., PARNOT C., CORVOL P. and CLAUSER E. A Functional Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP)-Tagged Angiotensin II AT(1A) Receptor Recruits the Endogenous Galphaq/11 Protein to the Membrane and Induces Its Specific Internalization Independently of Receptor- G Protein Coupling in HEK-293 Cells. *Mol. Endocrinol.* 15 : 294-307, 2001.

JUNOT C., GONZALES M.-F., EZAN E., COTTON J., VAZEUX G., MICHAUD A., AZIZI M., VASSILIOU S., YIOTAKIS A., CORVOL P. and DIVE V. RXP407, a selective inhibitor of the N-domain of angiotensin I-converting enzyme, blocks *in vivo* the degradation of hemoregulatory peptide Acetyl-Ser-Asp-Lys-Pro with no effect on angiotensin I hydrolysis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 297 : 606-611, 2001.

EYRIES M., MICHAUD A., DEINUM J., AGRAPART M., CHOMILLER J., KRAMERS C. and SOUBRIER F. Increased shedding of angiotensin-converting enzyme by a mutation identified in the stalk region. *J. Biol. Chem.* 276 : 5525-5532, 2001.

REAUX A., DE MOTA N., SKULTETYOVA I., LENKEI Z., EL MESSARI S., GALLATZ K., CORVOL P., PALKOVITS M. and LLORENS-CORTES C. Physiological role of a novel neuropeptide, apelin, and its receptor in the rat brain. *J. Neurochem.* 77 : 1085-1096, 2001.

VUAGNAT A., GIACCHE M., HOPKINS P.N., AZIZI M., HUNT S.C., VEDIE B., CORVOL P., WILLIAMS G.H. and JEUNEMAITRE X. Blood pressure response to angiotensin II, low-density lipoprotein cholesterol and polymorphisms of the angiotensin II type 1 receptor gene in hypertensive sibling pairs. *J. Mol. Med.* 79 : 175-183, 2001.

NISHIMURA H., XI Z., ZHANG L., KEMPF H., WIDEMAN R.F. and CORVOL P. Maturation-dependent neointima formation in fowl aorta. *Comp. Biochem. Physiol.* 130 : 39-54, 2001.

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. Med.* 7 : 115-124, 2001.

NUYT A.-M., LENKEI Z., CORVOL P., PALKOVITS M. and LLORENS-CORTES C. Ontogeny of angiotensin II type 1 receptor mRNAs in fetal and neonatal rat brain. *J. Comp. Neurol.* 440 : 192-203, 2001.

DISSE-NICODEME S., DESITTER I., FIQUET-KEMPF B., HOUOT A.-M., STERN N., DELAHOUSSE M., POTIER J., ADER J.-L. and JEUNEMAITRE X. Genetic heterogeneity of familial hyperkalaemic hypertension. *J. Hypertens.* 19 : 1957-1964, 2001.

HUS-CITHAREL A., BOUBY N., MARCHETTI J., CHANSEL D., GOIDIN D., GOURDJI D., CORVOL P. and LLORENS-CORTES C. Densitization of type 1 angiotensin II receptor subtypes in the rat kidney. *Endocrinology* 142 : 4683-4692, 2001.

ITURRIOZ X., ROZENFELD R., MICHAUD A., CORVOL P. and LLORENS-CORTES C. Study of asparagine 353 in aminoplastie A : Characterization of a novel motif (GXMEN) implicated in exopeptidase specificity of monozinc aminopeptidases. *Biochemistry* 40 : 14440-14448, 2001.

CRUZ A., PARNOT C., RIBATTI D., CORVOL P. and GASC J.-M. Endothelin-1, a regulator of angiogenesis in the chick chorioallantoic membrane. *J. Vasc. Res.* 38 : 536-545, 2001.

GIMENEZ-ROQUEPLO A.-P., FAVIER J., RUSTIN P., MOURAD J.-J., PLOUIN P.-F., CORVOL P., RÖTIG A. and JEUNEMAITRE X. The R22X mutation of the SDHD gene in hereditary paraganglioma abolishes the enzymatic activity of complex II in the mitochondrial respiratory chain and activated the hypoxia pathway. *Am. J. Hum. Genet.* 69 : 1186-1197, 2001.

GERMAIN S., FUCHS S., PHILIPPE J., CORVOL P. and PINET F. New éléments in human renin promoter involved in cell-specific expression. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 28 : 1056-1059, 2001.

PARDANAUD L., MOYON D. and EICHMANN A. L'embryologie des vaisseaux. *Médecine Sciences* 5 : 543-552, 2001.

MOYON D., PARDANAUD L., BREANT C., YUAN L. and EICHMANN A. Selective expression of the tie-2 ligands angiopoietin 1 and 2 in mesenchymal cells surrounding arteries and veins of the avian embryo. *Mech. Dev.* 106 : 133-136, 2001.

MOYON D., PARDANAUD L., YUAN L., BREANT C. and EICHMANN A. Plasticity of endothelial cells during arterial-venous differentiation in the avian embryo. *Development* 128 : 3359-3370, 2001.

KARKKAINEN M.J., SAARISTO A., JUSSILA L., KARILA K.A., LAWRENCE E.C., PAJUSOLA K., BUELER H., EICHMANN A., KETTUNEN M.I., YLÄ-HERTTUALA S., FINEGOLD D.N., FERRELL R.E. and ALITALO K. A model for gene therapy of human hereditary lymphedema. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98 : 12677-12682, 2001.

PAPOUTSI M., TOMAREV S.I., EICHMANN A., PROLS F., CHRIST B. and WILTING J. Endogenous origin of the lymphatics in the avian chorioallantoic membrane. *Dev. Dyn.* 222 : 238-251, 2001.

WILTING J., PAPOUTSI M., OTHMAN-HASSAN K., RODRIGUEZ-NIEDENFUHR M., PROLS F., TOMAREV S.I. and EICHMANN A. Development of the avian lymphatic system. *Microsc. Res. Tech.* 55 : 81-91, 2001.

CAPRIOLI A., MINKO K., DREVON C., EICHMANN A., DIETERLEN-LIÈVRE F. and JAFFREDO T. Hemangioblastic commitment in the avian allantois : cellular and molecular aspects. *Dev. Biol.* 238 : 64-78, 2001.

EGIDY G., BAVIERA E., CIUFFO G., CORVOL P. and PINET F. Localization of the endothelin system in aldosterone-producing adenomas. *Hypertension* 38 : 1137-1142, 2001.

ACHARD J.-M., DISSE-NICODEME S., FIQUET-KEMPF B. and JEUNEMAITRE X. Phenotypic and genetic heterogeneity of familial hyperkalaemic hypertension (Gordon syndrome). *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 28 : 1048-1052, 2001.

CRONIER L., BASTIDE B., DEFAMIE N., NIGER C., POINTIS G., GASC J.-M. and MALASSINE A. Involvement of gap junctional communication and connexin expression in trophoblast differentiation of the human placenta. *Histol. Histopathol.* 16 : 285-295, 2001.

MASSIERA F., BLOCH-FAURE M., CEILER D., MURAKAMI K., FUKAMIZU A., GASC J.-M., QUIGNARD-BOULANGE A., NEGREL R., AILHAUD G., SEYDOUX J., MENETON P. and TBOUL M. Adipose angiotensinogen is involved in adipose tissue growth and blood pressure regulation. *FASEB J.* 15 : 2727-2729, 2001.

FAVIER J., KEMPF H., CORVOL P. and GASC J.-M. Coexpression of Endothelial PAS Protein 1 with essential angiogenic factors suggests its involvement in human vascular development. *Dev. Dyn.* 222 : 377-388, 2001.

FIQUET-KEMPF B., LAUNAY-MIGNOT P., BOBRIE G. and PLOUIN P.-F. Is primary aldosteronism under-diagnosed in clinical practice ? *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 28 : 1083-1086, 2001.

PLOUIN P.-F., DUCLOS J.-M., SOPPELSA F., BOUBLIL G. and CHATELLIER G. Factors associated with perioperative morbidity and mortality in patients with pheochromocytoma : analysis of 165 operations at a single center. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86 : 1480-1486, 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.

VEDIE B., JEUNEMAITRE X., MEGNIEN J.-L., ATGER V., SIMON A. and MOATTI N. A new DNA polymorphism in the 5' untranslated region of the human SREBF-1a gene is related to development of atherosclerosis in asymptomatic men. *Atherosclerosis* 154 : 589-597, 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.

BLANCHARD A., JEUNEMAITRE X., COUDOL P., DECHAUX M., FROISSART M., MAY A., DEMONTIS R., FOURNIER A., PAILLARD M. and HOUILLIER P. Functional evidence that paracellin-1 is critical for magnesium and calcium reabsorption in the human thick ascending limb of Henlé. *Kidney Int.* 59 : 2206-2215, 2001.

WILSON F., DISSE-NICODEME S., CHOATE K., ISHIKAWA K., NELSON-WILLIAMS C., DESITTER I., GUNEL M., MILFORD D., LIPKIN G., ACHARD J.-M., FEELY M., DUSSOL B., BERLAND Y., UNWIN R., SIMON D., FARFEL Z., JEUNEMAITRE X. and LIFTON R.P. Human hypertension caused by mutations in WNK kinases. *Science* 293 : 1107-1112, 2001.

FISHER N.D., HURWITZ S., JEUNEMAITRE X., PRICE D.A., WILLIAMS G.H. and HOLLENBERG N.K. Adrenal response to angiotensin II in black hypertension : lack of sexual dimorphism. *Hypertension* 38 : 373-378, 2001.

BOUTOUYRIE P., GERMAIN D., TROPEANO A.I., LALOUX B., CARENZI F., ZIDI M., JEUNEMAITRE X. and LAURENT S. Compressibility of the carotid artery in patients with pseudoxanthoma elasticum. *Hypertension* 38 : 1181-1184, 2001.

HANON O., LUONG V., MOURAD J.J., BORTOLOTO L.A., JEUNEMAITRE X. and GIRERD X. Aging, carotid artery distensibility, and the Ser422Gly elastin gene polymorphism in humans. *Hypertension* 38 : 1185-1189, 2001.

LEROLLE N., COULET F., LANTZ B., PAILLARD F., HOUILLIER P., SOUBRIER F., GATTEGNO B., JEUNEMAITRE X., RONCO P. and RONDEAU E. No evidence for point mutations of the calcium-sensing receptor in familial idiopathic hypercalciuria. *Nephrol. Dial. Transplant* 16 : 2317-2332, 2001.

FAKHOURI F., LA BATIDE ALANORE A., REROLLE J.-P., GUERY B., RAYNAUD A. and PLOUIN P.-F. Presentation and revascularization outcomes in patients with radiation-induced renal artery stenosis. *Am. J. Kidney Dis.* 38 : 302-309, 2001.

GICQUEL C., BERTAGNA X., GASTON V., COSTE J., LOUVEL A., BAUDIN E., BERTHERAT J., CHAPUIS Y., DUCLOS J.-M., SCHLUMBERGER M., PLOUIN P.-F., LUTON J.-P. and LE BOUC Y. Molecular markers and long-term recurrences in a large cohort of patients with sporadic adrenocortical tumors. *Cancer Res.* 61 : 6762-6767, 2001.

GUÉRY B., LAUNAY-MIGNOT P., PICARD C., COUPAYE M. and PLOUIN P.-F. Indications et résultats de la revascularisation des sténoses athéroscléreuses de l'artère rénale. *Presse Med.* 30 : 1456-61, 2001.

INGLIS G.C., PLOUIN P.-F., FRIEL E.C., DAVIES E., FRASER R. and CONNELL J.M. Polymorphic differences from normal in the aldosterone synthase gene (CYP11B2) in patients with primary hyperaldosteronism and tumour (Conn's syndrome). *Clin. Endocrinol. (Oxf)* 54 : 725-730, 2001.

LA BATIDE-ALANORE A., AZIZI M., FROISSART M., RAYNAUD A. and PLOUIN P.-F. Split renal function outcome after renal angioplasty in patients with unilateral renal artery stenosis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 12 : 1235-1241, 2001.

PLOUIN P.-F., ROSSIGNOL P. and BOBRIE G. Atherosclerotic renal artery stenosis : to treat conservatively, to dilate, to stent or to operate ? *J. Am. Soc. Nephrol.* 12 : 2190-2196, 2001.

PLOUIN P.-F., ROSSIGNOL P., STUIT L. and GUERY B. Medication and revascularization for renovascular disease. *Kidney Blood Press. Res.* 24 : 375-377, 2001.

2002

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

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

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

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

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

EXPOSÉS, CONGRÈS

Monsieur Pierre Corvol a participé aux congrès et réunions suivants : Gordon Research Conference (Angiotensin, Ventura, 11-15 mars 2001 ; Gordon Lecture) ; 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 Pagano et Xavier Houard ont participé aux congrès suivants : Gordon Research Conférence sur l'angiotensine, Ventura (Californie), mars 2001 (communication affichée) ; Congrès du Groupe de Réflexion sur la Recherche Cardio-vasculaire, avril 2001, Montpellier, (communication affichée primée).

Madame Monnot et son équipe ont participé au congrès suivants : GRRC — Montpellier — avril 2001.

Anne Eichmann a participé à : Receptors in embryonic vessel development. VIIIth DBMS/IBS workshop : Cellular and Molecular Aspects of Angiogenesis. Autrans, France, January 24-27, 2001.

Luc Pardanaud a participé à : Invitation au Colloque de la SCMC : Neurogenèse et néoangiogenèse, 22 juin 2001, Paris. Ontogenèse du système endothélial.

Judith Favier a participé à : « Facteurs de transcription de l'angiogenèse » aux X^{es} Journées Européennes de la Société Française de Cardiologie (Paris, janvier 2001).

Mme Catherine Llorens-Cortes et son équipe ont participé aux congrès suivants : Colloque organisé par la Chaire de Médecine Expérimentale, Collège de France, intitulé « Récepteurs Couplés aux Protéines G : Structure et Interaction avec Leurs Partenaires *G-Protein Coupled Receptors: Structure and Interaction with Partners*, Paris, France, 3 avril 2001. *Récepteurs orphelins : de la découverte du ligand au rôle physiologique. Application à l'apéline* ; XXX^e Colloque de la Société de Neuroendocrinologie à Spa en Belgique. 30 septembre-3 octobre Symposium II : Nouveaux ligands des récepteurs orphelins couplés aux protéines G.

M. Xavier Jeunemaitre et son équipe ont participé aux congrès suivants : « Tests génétiques et hypertension » *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^e Congress of the Portuguese Society of Cardiology*, 10-13 avril 2001 ; « Syndrome de Gordon », *Actualités Néphrologiques Jean Hamburger*, Hôpital Necker, 7-8 mai 2001 ; « Genetics of cardiovascular diseases: Which polymorphisms do really count ? » *European Research Council for High Blood Pressure*, Noordwijkerhooft, October 26th 2001 ; « Aspects génétiques de l'hypertension artérielle » Conférence plénière, *Société Française d'Hypertension Artérielle*, Paris, 12 décembre 2001 ; « Genetics of arterial hypertension », Meeting on Genetics of Cardiovascular and Metabolic Diseases, Lausanne, 7-8 février 2002 ; « Génétique des Hypertensions hyperkaliémiques familiales », Genetics of Cardiovascular diseases, Collège de France Paris, 26 mars 2002 ; « New genes involved in arterial hypertension », *Gordon Conference on Angiotensin*, Italy, 6-10 May 2002.

LISTE DES DIPLÔMÉS

DEAs

Gabin Sinh : DEA d'Endocrinologie et Interactions Cellulaires — Paris XI (Soutenance le 10 juillet 2002)

Amino-peptidase N : Ontogénèse et rôle fonctionnel dans l'angiogénèse embryonnaire et pathologique.

Aurélié Cazes : DEA Physiopathologie Cellulaire et Moléculaire — Paris VI (Soutenance le 3 juillet 2002)

Caractérisation de l'Angiopoietin-like protein 4 (ANGPTL-4) lors des processus d'hypoxie/angiogénèse : développement d'outils fondamentaux.

Céline Amy : DEA de Différenciation Cellulaires et Fonctions Intégrées — Paris VI (Soutenance le 3 juillet 2002)

Caractérisation de l'expression d'hARP4, human angiopoietin-related protein, dans les tumeurs malignes humaines.

Céline Delaloy : DEA de Génétique Humaine — Paris VII (Soutenance le 5 juillet 2002)

Régulation transcriptionnelle in vitro du gène WNK1, responsable de l'hypertension hyperkaliémique familiale : recherche du mécanisme de la fonctionnalité d'une mutation intronique.

THÈSE

Sandra Disse-Nicodème : Thèse de Doctorat d'Université, Spécialité : Génétique Humaine — Paris VI (Soutenance le 25 septembre 2001)

Localisation et identification de gènes impliqués dans le pseudohypoaldostérisme de type II, une forme mendélienne d'hypertension artérielle.