

Médecine expérimentale

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

ENSEIGNEMENT

Pas de cours.

ACTIVITÉ DU LABORATOIRE

I. Contrôle moléculaire du développement vasculaire

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

Chercheurs post-doctoraux : Raquel del Toro, espagnole ; Isabelle Brunet, française ; Vitor Fortuna, brésilien ; Maria Machado, portugaise ; Brunella Christofari, italienne ; Marcella Faria, brésilienne ; Claudia Prahst, allemande.

Étudiants : Karine Bouvrée, thèse 4^e année ; Yunling Xu, thèse 4^e année ; Thomas Mathivet thèse 3^e année.

1. Contrôle moléculaire du guidage des capillaires : sélection des « tip cells »

L'angiogenèse par bourgeonnement dépend de cellules endothéliales (CE) spécialisées, appelés « tip cells », qui sont situées à l'extrémité des capillaires. Ces cellules expriment un taux élevé de Delta-like 4 (Dll4), un ligand de Notch. L'inactivation génique d'un allèle de *dll4* chez la souris provoque une formation excessive de tip cells dans le réseau capillaire rétinien (Suchting *et al.*, 2007, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104, 3225). L'inactivation de *dll4* s'accompagne d'un changement des taux d'expression des récepteurs du VEGF, indiquant que Dll4 régule négativement la réponse des CE au VEGF et freine cette signalisation, contrôlant ainsi la formation d'un nombre limité de tip cells (Tammela *et al.*, 2008, *Nature*, 454, 656).

Nos résultats révèlent que la quasi-totalité des CE des rétines de souris mutées pour *Dll4* ont des caractéristiques morphologiques (extension de filopodes) et génétiques des *tip cells* (expression de quelques marqueurs connus des *tip cells*, tels que le *platelet-derived growth factor* β , PDGF β , et *Unc5b*). Nous avons ainsi développé un modèle permettant d'isoler les *tip cells* en grand nombre et de déterminer leur transcriptome. L'analyse des gènes surexprimés dans les CE de souris *dll4*^{+/-} a permis d'identifier de nouveaux marqueurs de *tip cells* [1]. Nous avons montré que les *tip cells* expriment des molécules telles qu'UPAR qui participent à la dégradation de la matrice extracellulaire, facilitant ainsi leur migration. Les *tip cells* synthétisent aussi la lame basale du capillaire [2]. Enfin, les *tip cells* sécrètent de nombreuses molécules qui leur permettent de communiquer avec leur environnement. Parmi ces molécules se trouvent l'angiopoïétine 2, ESM-1 et l'apeline qui se lie à des récepteurs exprimés par les CE situées juste en arrière des *tip cells*. Ces dernières CE forment la lumière du capillaire. L'analyse de mutants murins déficients pour les gènes codant pour l'apeline et son récepteur APJ montre que ce système ligand/récepteur régule la prolifération capillaire. L'analyse du transcriptome des *tip cells* permet ainsi de découvrir plusieurs des molécules nécessaires au guidage et à la croissance des capillaires [1].

2. Facteurs de guidage des axones dans le système vasculaire

Le bourgeonnement des capillaires présente des similarités anatomiques et moléculaires avec celui des axones en croissance. Comme les *tip cells*, qui sont situées en tête des capillaires, les cônes de croissances sont placés à l'extrémité de l'axone. Les cônes de croissance émettent de nombreux filopodes qui répondent aux facteurs de guidage présents dans l'environnement tissulaire. Plusieurs récepteurs des facteurs de guidage des axones sont exprimés à la fois dans les vaisseaux sanguins et les vaisseaux lymphatiques, notamment les récepteurs neuropilines (NRP) 1 et 2. Ces récepteurs n'ont pas de domaine connu de signalisation dans leur partie cytoplasmique mais forment un complexe avec d'autres récepteurs ; l'interaction de ces molécules influence la transduction du signal. Dans le système nerveux, les NRP forment des complexes avec des récepteurs plexines pour transduire les effets des sémaphorines intervenant dans le guidage des axones. Dans le système vasculaire, la NRP-2 régule la lymphangiogenèse en liant le VEGF-C en formant un complexe avec le VEGFR3 [3, 4]. Nous avons montré que la liaison du VEGF-C à la NRP2 est responsable d'une étape particulière du développement lymphatique, à savoir le bourgeonnement de « *tip cells* » lymphatiques. Lors d'un traitement par un anticorps bloquant NRP2, ou chez les mutants *Nrp2*^{+/-} ; *VEGFR3*^{+/-}, ces bourgeons disparaissent dans leur quasi-totalité. Le réseau lymphatique de l'animal est malformé. Il peut proliférer, mais les ramifications ne se développent pas [3]. Ces résultats soulignent que les récepteurs du guidage des axones régulent l'activité des récepteurs du VEGF dans le système vasculaire. Les ephrines, comme les NRPs, régulent l'angiogenèse par une coopération fonctionnelle avec les récepteurs du VEGF [5].

II. Hypoxie, angiogenèse : protéines matricielles en pathologie cardiovasculaire et tumorale

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

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

Étudiants : E. Gomez, 4^e année de thèse ; N. Bréchet, 4^e année de thèse ; S. Gauvrit, 3^e année de thèse ; C. Pichol-Thievend, 1^{re} année de thèse ; N. Beckouche, 1^{re} année de thèse ; G. Briois, M2 ; A. Frisdal, M2.

La séquence d'événements biologiques permettant à un organisme de maintenir la survie de ses tissus lors des processus ischémiques est mal connue. L'étude des mécanismes moléculaires impliqués dans l'hypoxie cellulaire ainsi que dans l'angiogenèse réactionnelle au cours des pathologies ischémiques et tumorales représente donc un enjeu médical et thérapeutique important, et constitue notre thème de recherche principal.

L'endothélium participe à la régulation de nombreuses réponses biologiques telles que l'hémostase, la réponse immunitaire et inflammatoire, la vasomotricité et l'angiogenèse. Son intégrité structurale et fonctionnelle est donc essentielle. L'endothélium est la cible de nombreux médiateurs physiopathologiques comme les cytokines pro-inflammatoires, les facteurs de croissance, le stress oxydatif et l'hypoxie. L'hypoxie, ou baisse de pression partielle en oxygène, est présente dans les pathologies cardiovasculaires ischémiques et tumorales. L'hypoxie du microenvironnement provoque une reprogrammation de l'expression de nombreux gènes codant pour des protéines impliqués dans la régulation de l'intégrité vasculaire et la reperfusion tissulaire. Nous proposons que les gènes régulés par l'hypoxie constituent des marqueurs diagnostiques et/ou des cibles thérapeutiques des processus ischémiques et tumoraux.

Parmi les gènes régulés par l'hypoxie figurent l'angiopoïétin-like 4 (*angptl4*) (Le Jan S. *et al.*, *Am. J. Pathol.*, 2003, 162,1521), la thrombospondine-1 (*tsp1*) (Favier J. *et al.*, *J. Pathol.*, 2005, 207, 358), l'IGF-Binding Protein-3 (*igfbp-3*), la neuritine et la thioredoxin-interacting protein (Le Jan S. *et al.*, *FEBS Lett*, 2006, 580, 3395). *Tsp1* et *angptl4* sont les gènes dont l'expression est la plus fortement induite tel que le révèle le criblage cDNA/RDA puces dans des pièces d'amputation de patients souffrant d'ischémie critique des membres inférieurs. *Angptl4* est aussi fortement exprimé dans certaines pathologies tumorales. Les questions sont alors les suivantes : 1) ces protéines exprimées dans les cellules vasculaires et les cellules inflammatoires constituent-elles des marqueurs de la situation ischémique qui conduit à l'hypoxie ? ou 2) participent-elles à la modulation de l'intégrité vasculaire

et de l'angiogenèse ? 3) si tel est le cas, par quel mécanisme ces protéines agissent-elles ? et enfin, 4) peuvent-elles constituer des cibles thérapeutiques dans les pathologies ischémiques cardiovasculaires et/ou tumorales ?

Afin de répondre à ces questions, l'ensemble de l'équipe a entrepris l'étude de l'expression et de la fonction des protéines codées par les gènes *tsp1* et *angptl4*.

1. Étude de TSP1

Le rôle de TSP1 comme inhibiteur de l'angiogenèse est connu depuis longtemps. Mais comment expliquer l'expression accrue d'une protéine aux propriétés anti-angiogéniques dans une situation d'ischémie chronique telle que l'artériopathie des membres inférieurs ? TSP1 est une glycoprotéine matricellulaire multifonctionnelle interagissant avec de nombreux composants de la matrice extracellulaire. Cette protéine trimérique de 450 kDa est impliquée dans l'inflammation, la réparation tissulaire, l'hémostase et l'angiogenèse. Dans l'artériopathie critique des membres inférieurs chez l'homme, nous avons montré que TSP1 est très fortement exprimée dans la partie ischémique du muscle. Cette donnée est à rapprocher du modèle d'ischémie aiguë de la patte de souris (triple ligature de l'artère fémorale qui nous a permis de décrire l'expression de la nétrine et de son récepteur unc5B) où nous avons trouvé que les souris *tsp1* KO sont protégées de la nécrose post-ischémique (financement *European Vascular Genomics Network*). Nous avons observé que les marqueurs pro-inflammatoires sont corrélés à la progression de la maladie et au risque d'amputation, ce qui nous a amené à étudier le profil d'activation des macrophages infiltrant le tissu ischémique. Ceux-ci expriment le marqueur Ly-6C (polarisation pro-inflammatoire M1) et sont doués de capacité de phagocytose importante chez les souris sauvages alors que Ly-6C est beaucoup moins exprimé chez les souris *tsp1* KO, signe d'une polarisation alternative moins inflammatoire. De plus, ces derniers phagocytent beaucoup moins efficacement les myoblastes nécrosés. La déplétion des monocytes circulants par du clodronate encapsulé dans des liposomes abolit la protection observée chez les souris *tsp1* KO. Nous postulons que cibler l'état d'activation des macrophages dans un tissu ischémique pourrait constituer une nouvelle stratégie thérapeutique de protection du tissu contre la nécrose. La régénération tissulaire pourrait s'effectuer *via* l'inhibition de la phagocytose et/ou de TSP1. Ces travaux montrent l'intérêt de la modulation M1 *vs* M2 de l'inflammation dans la régulation de l'angiogenèse post-ischémique (Brechot N. *et al.*, *PLoS One*, 2008, 3, e3950)

2. Étude d'ANGPTL4

Le gène *angptl4* code pour ANGPTL4, une protéine sécrétée de 406 acides aminés, qui ne se lie pas au récepteur Tie2. Elle joue un rôle dans la régulation du métabolisme glucidique et lipidique par inhibition de la lipoprotéine lipase, *via* un mécanisme différent de celui d'ANGPTL3. Son effet sur la croissance des

néovaisseaux semble dépendant du modèle étudié : elle est proangiogénique dans le modèle de la membrane chorioallantoïdienne de poulet (CAM) tandis qu'elle inhibe la réponse induite par le VEGF dans le modèle de la cornée de rat.

Nous avons caractérisé les propriétés *in vitro* d'ANGPTL4 et montré qu'il s'agit d'une protéine sécrétée, présente sous deux formes distinctes : soluble dans le milieu de culture où elle est soumise à une protéolyse extracellulaire et, par ailleurs, matricielle, associée à la matrice extracellulaire (MEC) subendothéliale et non protéolysée (Cazes A. *et al.*, *Circ. Res.*, 2006, 99, 1207). La forme matricielle d'ANGPTL4 interagit avec la MEC, *via* les héparanes sulfates protéoglycans et inhibe l'adhésion et la migration des cellules endothéliales (CE). Ce processus s'accompagne d'une diminution des fibres de stress et des points focaux d'adhésion. Nous avons alors mis au point une procédure de purification d'ANGPTL4 entière et des deux domaines, *coiled-coil* N^t et *fibrinogen-like* C'. Nous avons étudié le rôle de ces deux domaines, montrant que l'interaction avec la MEC est due au domaine *coiled-coil* et que les propriétés de régulation de l'angiogenèse d'ANGPTL4 en dépendent aussi [6]. Nos résultats montrent qu'ANGPTL4 est d'une part un marqueur des pathologies tumorales et, d'autre part, un acteur de la modulation de l'angiogenèse et de la perméabilité vasculaire.

Les projets que nous développons actuellement visent 1) à caractériser le rôle d'ANGPTL4 *in vitro* sur les CE et *in vivo* dans des modèles précliniques en utilisant les souris dont le gène *angptl4* est invalidé, et 2) à développer des outils propres, brevetables, de production et de mesure de la protéine ANGPTL4 chez l'homme.

En 2003, nous avons montré qu'ANGPTL4 était exprimé dans les carcinomes rénaux à cellules claires (Le Jan S. *et al.*, *Am. J. Pathol.*, 2003, 162, 1521), qui représentent deux tiers des cancers du rein de l'adulte. Les cancers du rein représentent 2,3 % des décès pour cause de cancer dans le monde, soit 26 400 cas en France et 102 000 cas dans le monde. Dans le cadre d'un contrat d'interface INSERM-AP-HP, nous avons analysé la valeur diagnostique et pronostique d'ANGPTL4 au niveau de l'ARN et de la protéine (PHRC National 2006, financement de 249 000 €). La partie rétrospective de cette étude est achevée et vient d'être publiée [7]. Dans une cohorte utilisant les tumorothèques annotées de plusieurs centres spécialisés, nous avons montré que l'ARNm d'*angptl4* est un marqueur spécifique du cancer du rein à cellules claires, quelque soit son statut VHL. La sensibilité d'ANGPTL4 en tant que marqueur de ce type de cancer rénal est de 100 % et sa spécificité est de 93,8 %. La valeur prédictive positive est de 92,3 % et la valeur prédictive négative de 100 %. De manière intéressante, ces fortes sensibilité et spécificité sont conservées en cas de métastases (86,7 % et 100 %, respectivement).

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

3. Recherche de protéines de la matrice extracellulaire exprimées lors de l'hypoxie

L'hypoxie peut entraîner une production de protéines dans la MEC. Une approche de protéomique différentielle, en électrophorèse bidimensionnelle, a été réalisée sans *a priori* par séparation des protéines de la MEC provenant de cultures primaires de CE (origine : micro- et macrovaisseaux) cultivées en normoxie ou en hypoxie. Cette approche permet l'analyse de facteurs bioactifs associés aux composants structuraux de la MEC. Ainsi, nous avons identifié par spectrométrie de masse des protéases et des enzymes de pontage et de réticulation de la MEC. Certaines de ces protéines sont accumulées dans la MEC subendothéliale hypoxique, en association avec des réseaux de collagènes et de laminines. L'expression de ces protéines est aussi fortement augmentée dans les tissus ischémiques de pattes ligaturées de souris. L'étude des protéines de pontage de la MEC se poursuit afin de déterminer leur rôle dans le remodelage matriciel et la réponse angiogénique.

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

III. Angiogenèse normale et pathologique (G. Nguyen / F. Lebrin)

Équipe : G. Nguyen, DR2 Inserm F. Lebrin, CR1 Inserm ; P. Corvol, Pr. Collège de France (CdF) ; N. Lamandé, MCU CdF ; H. Kempf, CR1 Inserm ; A. Michaud, IE Inserm ; S. Martin, CDD IE Inserm, I. Queguiner, AI CdF ;

Post-doctorants : E. Larger, APHP, C. Costa-Netto, Brésil.

Étudiants : A. Bessonnat, 4^e année de thèse, M. Leroux-Berger, 3^e année de thèse ; C. Cousin, 2^e année de thèse, D. Bracquard, 2^e année de thèse, S. Srun ; 2^e année de thèse, A. Lemoine, M2.

Nos travaux portent sur le rôle du récepteur de la prorénine (PRR) et de la signalisation du *Transforming Growth Factor-β* (TGF-β) au cours de l'embryogenèse et dans le développement des pathologies humaines.

1. Récepteur de la prorénine et système rénine angiotensine (G. Nguyen)

Un nouveau composant du système rénine angiotensine (SRA), le récepteur de la rénine et de la prorénine (PRR), a été découvert en 2002 (Nguyen G. *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 109, 1417). Ce récepteur lie *in vitro* la rénine et la prorénine, favorise l'activation de la prorénine en rénine et stimule directement l'activité des MAP kinases en culture de cellules. Toutefois sa fonction *in vivo* reste en grande part à découvrir. Nous avons publié une étude sur l'expression de PRR dans le cerveau de souris adulte et sur son rôle dans la différenciation neuronale, en collaboration avec Annette Koulakoff, (Inserm U840, Collège de France, Paris) et Charles Schwartz (Greenwood Genetic Center, États-Unis). Ces travaux ont montré qu'une mutation de PRR était responsable d'un retard mental lié à l'X. La mutation provoque le codage d'un récepteur tronqué qui se comporte comme un dominant négatif [8].

Nous avons mis en évidence l'existence d'une forme soluble de PRR (sPRR) présente dans le plasma [9]. Nous avons obtenu un financement Inserm/Direction de l'hospitalisation et de l'organisation des soins (DHOS) pour développer un test ELISA permettant de doser sPRR dans le plasma et l'urine. sPRR pourrait être un marqueur de sévérité des affections cardiaques et rénales. Une recherche translationnelle est effectuée en collaboration avec M. Azizi du Centre d'investigation clinique de l'hôpital européen Georges Pompidou à Paris et avec une équipe du Max Delbrück Center for Molecular Medicine à Berlin et la compagnie CellTrend (Luckenwalde, Allemagne).

Afin de connaître le rôle de PRR, il est indispensable de disposer de souris dont le gène *PRR* était inactivé. Les techniques classiques d'inactivation génique se sont révélées infructueuses du fait de la létalité introduite par l'inactivation de *PRR* dans les cellules souches. Des souris floxées pour le gène *PRR* ont été générées. Elles permettront d'établir le rôle physiopathologique de PRR dans l'hypertension artérielle et les atteintes tissulaires associées à l'hypertension, ainsi que dans la néphropathie diabétique. Ces études sont menées en collaboration avec le Max Delbrück Center et Experimental and Clinical Research Center à Berlin, avec les équipes de Dominik Muller et Michael Bader (financement conjoint Inserm/ministère des Affaires étrangères et européennes/DFG et financement Programme Hubert Curien « Procope »).

PRR marqué par hybridation *in situ* est exprimé de façon importante au stade de morula (2,5 j) et de blastocyste (3,5 j) dans la masse cellulaire interne qui donnera l'embryon à proprement parler, et dans le trophoblaste qui donnera les tissus extra-embryonnaires. Les croisements des souris cKO/PRR avec des souris porteurs d'une Cre recombinase sous contrôle du promoteur ubiquitaire PGK révèlent que la délétion de *PRR* est létale à des stades extrêmement précoces. De plus, nous avons montré que la surexpression de *PRR* soluble semblait améliorer la reprogrammation de fibroblastes de souris en cellules pluripotentes induites (IPs), confirmant que PRR est un gène essentiel au développement embryonnaire. Ces données passionnantes sur un nouveau rôle de PRR nous amènent à développer un nouvel axe de recherche centré sur les fonctions de PRR au cours du développement et dans la reprogrammation cellulaire. Pour ce faire, le groupe a été rejoint par Franck Lebrin, CR1 Inserm, expert des cellules ES et IPs, et qui était auparavant dans le groupe de Anne Eichmann dans l'U833.

2 Fonctions de la signalisation TGF- β

La télangectasie hémorragique héréditaire (HHT) est une maladie vasculaire autosomique dominante causée par des mutations des gènes codant pour endogline et ALK1, deux récepteurs de la signalisation du TGF- β exprimés dans les cellules endothéliales. Les symptômes cliniques sont marqués par de sévères et fréquents saignements de nez qui posent parfois un grave problème thérapeutique. La thalidomide, un médicament qui avait été utilisé chez les femmes enceintes et retiré du marché en raison de ses effets dévastateurs sur le développement foetal,

a une activité puissante sur la maturation de la paroi vasculaire. Nous venons de montrer que le traitement de patients HHT par la thalidomide réduit la sévérité et le nombre de saignements. Par ailleurs, un modèle de souris où le corécepteur du VEGF est inactivé nous a permis de préciser le mécanisme d'action de la thalidomide. La thalidomide stimule le recrutement péricytaire autour des vaisseaux et accroît la production de PDGF- β , un médiateur clé de la régulation et de la stabilisation des cellules murales [10]. Nous sommes en train de générer des modèles de différenciation de cellules souches embryonnaires (ESC) et de cellules souches pluripotentes induites (iPS) murines et humaines de la maladie pour étudier les mécanismes responsables du développement de cette pathologie et cribler de nouveaux composés thérapeutiques. La thalidomide, par ses actions sur la maturation vasculaire, pourrait s'avérer efficace en clinique pour diminuer les saignements chez ces malades et améliorer leur qualité de vie.

3. Mécanismes de la formation des calcifications de la paroi vasculaire (H. Kempf)

La calcification des vaisseaux est une complication fréquente de nombreuses pathologies (athérosclérose, diabète ou insuffisance rénale) mettant notamment en jeu la formation de cartilage et d'os dans l'environnement vasculaire. Notre projet propose de comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires à l'origine des calcifications vasculaires. Les travaux du groupe se sont alors articulés sur 2 axes.

1. Initiation des calcification vasculaires et hétérogénéité des cellules musculaires

Nous avons réalisé une analyse de l'apparition et de la progression des lésions calcifiées dans un modèle de souris développant des calcifications spontanées : les souris déficientes en *Matrix Gla Protein* (*Mgp*^{-/-}, don de G. Karsenty, Columbia University, New York, États-Unis), un inhibiteur de BMPs et des calcifications. Cette analyse a révélé une cinétique d'évolution très dynamique de ces calcifications et mis notamment en évidence un stade et une localisation très spécifiques d'apparition des calcifications. En effet, nos études montrent que les premières lésions apparaissent toujours 4-5 jours après la naissance des individus dans une région limitée de l'arc aortique. Après cette phase d'initiation, l'ensemble du tronc aortique se calcifie alors progressivement et de façon très rapide.

Nous avons émis l'hypothèse que l'apparition très localisée des calcifications pourrait être liée à l'origine embryonnaire particulière des cellules musculaires lisses qui sont présentes dans la crosse de l'aorte. En effet, ces cellules musculaires lisses proviennent de cellules de la crête neurale alors que celles qui constituent le reste de l'aorte sont d'origine mésodermique. Menés principalement par Margot Leroux-Berger, étudiante en dernière année de thèse financée par la FRM, des travaux réalisés sur des explants d'aortes ou des cellules musculaires lisses isolées de ces différentes régions ont révélé une aptitude différente à calcifier selon la région d'origine. Ainsi, comparée à la région abdominale aortique, la crosse de l'aorte est plus rapide à se minéraliser dans des conditions identiques mimant une situation

pathologique calcifiante, à savoir une concentration en phosphate inorganique élevée similaire à l'hyperphosphatémie présente chez les insuffisants rénaux.

Ces travaux *ex vivo* et *in vitro* sont à mettre en parallèle à nos observations chez l'animal déficient en *Mgp* et suggèrent une corrélation (voire une influence directe) entre l'origine embryonnaire des cellules musculaires lisses et la réponse de ces mêmes cellules chez l'adulte soumis à des conditions pathologiques. Ils suggèrent qu'en plus des nombreux facteurs déjà impliqués dans l'apparition des calcifications, l'origine des cellules musculaires lisses constitue également un facteur non suspecté jusqu'alors.

2. Rôle de BMP2 dans l'initiation des calcifications vasculaires

L'arrivée d'un nouvel étudiant postdoctoral brésilien, Thiago Maciel (contrat UPMC) en septembre 2008 a permis d'aider Julie Sainz, chercheur postdoctoral financé par la FRM, sur son projet concernant les signaux impliqués dans l'initiation des calcifications potentiellement attribuables à une transition chondrogénique des cellules musculaires lisses vasculaires. Dans ce projet, nous nous sommes particulièrement intéressés aux signaux de type BMPs notamment celui de BMP2, un acteur important dans le processus de calcification vasculaire [11]. En effet, lors de l'apparition des calcifications vasculaires chez l'homme et dans des modèles murins, il a été clairement démontré une surexpression de BMP2 suggérant son implication dans le processus. D'autres études ont montré que cette même molécule exerce un pouvoir chondrogénique et ostéogénique *in vitro* dans des cellules mésenchymateuses de type C3H10T1/2 ou dans des cultures primaires de cellules musculaires lisses vasculaires. Nos travaux ont mis en évidence que l'effet calcifiant de l'hyperphosphatémie était dû à la stimulation de l'expression de BMP2. Des expériences utilisant les lignées cellulaires déficientes en BMP2 (obtenues par l'action de siRNA spécifiques ou à partir de cellules provenant de souris déficientes en BMP2) ont confirmé ces données. En effet, en l'absence de production de BMP2, ces cellules ne se minéralisent pas, même en présence de fortes concentrations de phosphate. Nous avons également montré, notamment grâce à l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques très récents, que l'effet de BMP2 était dû à l'activation de la voie Smad. Ces résultats sont importants car ils démontrent pour la première fois la voie responsable de l'effet calcifiant de BMP2. Ils permettent d'envisager à terme un traitement thérapeutique plus ciblé.

PUBLICATIONS DU LABORATOIRE 2009-2010

[1] Del Toro R., Prahst C., Mathivet T., Siegfried G., Kaminker J., Larrivé B., Bréant C., Duarte A., Takakura N., Fukamizu A., Penninger J., Eichmann A., « Identification and functional analysis of novel endothelial tip cell enriched genes », *Blood*, 2010, *in press*.

[2] Germain S., Monnot C., Muller L., « Hypoxia-driven angiogenesis : role of tip cells and extracellular matrix scaffolding », *Curr. Op. Hematol.*, 17, 2010, 245-51.

[3] Xu Y., Yuan L., Mak J., Pardanaud L., Caunt M., Kasman I., Larrivée B., Suchting S., del Toro R., Medvinsky A., Yang J., Kolodkin A., Thomas J.L., Koch A., Alitalo K., Eichmann A.*, Bagri A.* (*equal contribution), « Neuropilin-2 mediates VEGF-C induced lymphatic sprouting together with VEGFR3 », *J. Cell Biol.*, 188, 2010, 115-30.

[4] Adams R.H., Eichmann A., « Axon guidance molecules in vascular patterning », in *Wiring the brain: the biology of neuronal guidance*, Cold Spring Harbor Perspect. Biol, 2, 2010, a001875.

[5] Germain S., Eichmann, A., « VEGF and Ephrin-B2 : a bloody duo », *Nat. Med.*, 2010, *in press*.

[6] Chomel C., Cazes A., Faye C., Bignon M., Gomez E., Ardidie-Robouant C., Barret A., Ricard-Blum S., Muller L., Germain S., Monnot C., « Interaction of the coiled-coil domain with glycosaminoglycans protects angiopoietin-like 4 from proteolysis and regulates its antiangiogenic activity » *FASEB J.*, 23, 2009, 940-949.

[7] Verine J., Lehmann-Che J., Soliman H., Feugeas J.P., Vidal J.S., Mongiat-Artus P., Belhadj S., Philippe J., Lesage M., Wittmer E., Chanel S., Couvelard A., Ferlicot S., Rioux-Leclercq N., Vignaud J.M., Janin A., Germain S., « Determination of angptl4 mRNA as a diagnostic marker of primary and metastatic clear cell renal-cell carcinoma », *PLoS One* 5, 2010, e10421.

[8] Contrepas A., Walker J., Koulakoff A., Franek K.J., Qadri F., Giaume C.B., Corvol P., Schwartz C.E., Nguyen G., « A role of the (pro) renin receptor in neuronal cell differentiation », *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 2009 (May 27) [Epub ahead of print].

[9] Cousin C., Bracquart D., Contrepas A., Corvol P., Muller L., Nguyen G., « Soluble form of the (pro)renin receptor generated by intracellular cleavage by furin is secreted in plasma », *Hypertension*, 53, 2009, 1077-1082.

[10] Lebrin F., Srun S., Raymond K., Martin S., van den Brink S., Freitas C., Bréant C., Mathivet T., Larrivée B., Thomas J.L., Arthur H.A., Westermann C.J.J., Disch F., Mager J.J., Snijder R.J., Eichmann A.*, Mummery C.* (*equal contribution), « Thalidomide enhances mural cell recruitment and reduces epistaxis in patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia », *Nat. Med.*, 16, 2010, 420-428.

[11] Maciel T.T., Kempf H., Campos A.H., « Targeting bone morphogenetic protein signaling on renal and vascular diseases », *Cur. Op. Neph. Hypertens*, 19, 2010, 26-31.

[12] Gratze P., Boschmann M., Dechend R., Qadri F., Malchow J., Graeske S., Engeli S., Janke J., Springer J., Contrepas A., Plehm R., Klaus S., Nguyen G., Luft F.C., Muller D.N., « Energy metabolism in human renin-gene transgenic rats: does renin contribute to obesity ? », *Hypertension*, 53, 2009, 516-523.

[13] Bot P.T., Hoefler I.E., Sluijter J.P., van Vliet P., Smits A.M., Lebrin F., Moll F., de Vries J.P., Doevendans P., Piek J.J., Pasterkamp G., Goumans M.J., « Increased expression of the transforming growth factor-beta signaling pathway, endoglin, and early growth response-1 in stable plaques », *Stroke*, 40, 2009, 439-447.

[14] Yvan-Charvet L., Massiera F., Lamande N., Ailhaud G., Teboul M., Moustaid-Moussa N., Gasc J.-M., Quignard-Boulangé A., « Deficiency of angiotensin type 2 receptor rescues obesity but not hypertension induced by overexpression of angiotensinogen in adipose tissue », *Endocrinology*, 150, 2009, 1421-1428.

[15] Vincent F., Bonnin P., Clemesly M., Contreres J.O., Lamande N., Gasc J.-M., Vilar J., Hainaud P., Tobelem G., Corvol P., Dupuy E., « Angiotensinogen delays angiogenesis and tumor growth of hepatocarcinoma in transgenic mice », *Cancer Res.*, 69, 2009, 2853-2860.

[16] Coupaye M., Puchaux K., Bogard C., Msika S., Jouet P., Clerici C., Larger E., Ledoux S., « Nutritional consequences of adjustable gastric banding and gastric bypass: a 1-year prospective study », *Obes. Surg.*, 19, 2009, 56-65.

[17] Suchting S., Eichmann A., « Jagged gives endothelial tip cells an edge », *Cell*, 137, 2009, 988-990.

[18] Larrivée B., Freitas C., Suchting S., Brunet I., Eichmann A., « Guidance of vascular development : lessons from the nervous system », *Circ. Res.*, 104, 2009, 428-441.

[19] Corsi J.M., Houbron C., Billuart P., Brunet I., Bouvrée K., Eichmann A., Girault J.-A., Enslin H., « Autophosphorylation-independent and dependent functions of Focal Adhesion Kinase during development », *J. Biol. Chem.*, 284, 2009, 34769-763.

[20] Le Dall J., Ho-Tin-Noé B., Louedec L., Meilhac O., Roncal R., Carmeliet P., Germain S., Michel J.-B., Houard X., « Immaturity of microvessels in hemorrhagic plaques is associated with proteolytic degradation of angiogenic factors », *Cardiovasc. Res.*, 47, 2009, 355-366.

[21] Abou-khalil R., Le grand F., Pallafacchina G., Valable S., Authier F.-J., Rudnicki M., Gherardi R., Germain S., Chretien F., Sotiropoulos A., Lafuste P., Montarras D., Chazaud B., « Autocrine and paracrine angiopoietin 1/tie-2 signalling promotes muscle satellite cell self-renewal », *Cell Stem Cell*, 5, 2009, 298-309.

CONTRATS EUROPÉENS

Lymphangiogenomics. Responsable : A. Eichmann – 327 000 € (2004-2009).

LISTE DES DIPLÔMES

Thèses

Elisa Gomez : thèse de doctorat de l'université Pierre et Marie Curie ; spécialité : physiologie et physiopathologie ; soutenue le 31 août 2009 : *Modulation de l'angiogenèse et de la perméabilité vasculaire par l'angiopoietin-like 4 au cours du développement et en conditions pathologiques.*

Aurélié Contrepas : thèse de doctorat de l'université Pierre et Marie Curie ; spécialité : physiologie et physiopathologie ; soutenue le 1^{er} juin 2010 ; *Expression et fonction du récepteur de la (pro)rénine au cours du développement embryonnaire et chez l'adulte.*

Margot Leroux-Berger : thèse de doctorat de l'université Pierre et Marie Curie ; spécialité : génomique, cellule, développement, microbiologie ; soutenue le 21 juin 2010 : *Différentiation des cellules de crêtes neurales céphaliques et maintien de leur dérivés : de l'embryon à la pathologie adulte.*

Nicolas Bréchet : thèse de doctorat de l'université Paris 7 – Denis Diderot ; spécialité : physiologie et physiopathologie de la circulation et de la respiration ; soutenue le 25 juin 2010 : *Rôle de la thrombospondine-1 dans l'ischémie critique des membres inférieurs.*

Karine Bouvrée : thèse de doctorat de l'université Paris 7 – Denis Diderot ; spécialité : biologie et physiologie de la circulation et de la respiration ; soutenue le 2 juillet 2010 : *Étude du rôle des molécules de guidage axonal Nétrine-1 et Sémaphorine-3A dans le développement vasculaire.*

Master 2

Gaëlle Brioso : master 2 – Biologie cellulaire et génétique, université Paris Sud 11, soutenu en juin 2010 : *Hypoxie et angiogenèse tumorale : Rôle de l'angiopoietine-like 4.*

Aude Frisdal : master 2 – Biologie moléculaire et cellulaire, université Pierre et Marie Curie, soutenu en juin 2010, *Le rôle de LOXL2 dans le recrutement de cellules murales au cours de l'angiogenèse.*

