

Médecine expérimentale

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

ANGIOGENÈSE ET ATHÉROME

Le cours de la Chaire de Médecine Expérimentale a porté en 2003-2004 sur le thème général de l'angiogenèse et de l'athérome, poursuivant ainsi une série de cours consacrée aux différentes facettes de l'angiogenèse en physiopathologie.

L'athérosclérose est une réponse inflammatoire à l'agression de la paroi artérielle par des agents physiques, chimiques, biologiques, voire infectieux. La réponse inflammatoire implique la mise en jeu, d'une part, des macrophages et des cellules T, et d'autre part des cellules endothéliales, des cellules musculaires lisses vasculaires et des fibroblastes adventitiels (*R. Ross — Atherosclerosis, an inflammatory disease. New Engl. J. Med. 340 : 115, 1999*). De nouveaux marqueurs biologiques et cliniques de la réponse inflammatoire vasculaire permettent de prédire le risque cardiovasculaire, en association avec les marqueurs classiques du risque vasculaire (*G. Blake, P. Ridken — Novel clinical markers of vascular wall inflammation. Circ. Res. 89 : 763, 2001*). L'inflammation active de la paroi conduit à la formation d'une plaque d'athérome qui peut devenir instable et aboutir à sa rupture ou à l'occlusion aiguë du vaisseau (la rupture de la plaque est responsable de près de 70 % des morts subites d'origine coronarienne) (*M. Naglavi et al., Circulation 108 : 1664, 2003*). Les différentes techniques d'imagerie permettent de suivre la progression de la plaque athéromateuse, expérimentalement et cliniquement (*Z.A. Fayad, V. Fuster — Clinical imaging of the high risk atherosclerotic plaque. Circ. Res. 89 : 305, 2001*).

Les vasa vasorum : Vasularisation de la paroi artérielle (coronaire et aorte) au cours de l'hypercholestérolémie et de l'hypertension expérimentales

Les vasa vasorum forment un réseau microvasculaire dans la couche adventitielle des artères de grand calibre, et aussi au niveau des coronaires. Il existe

une corrélation entre l'étendue de la néovascularisation par les vasa vasorum et la sévérité de l'athérosclérose dans les coronaires humaines. L'induction d'une hypercholestérolémie chez le porc aboutit à une augmentation de la néovascularisation des vasa vasorum des coronaires. L'étude par scanner microscopique révèle que les microvaisseaux de 2^e ordre sont plus nombreux et désorganisés. Cette néovascularisation peut jouer un rôle dans le remodelage athéromateux (*H.M. Kwon et al., Enhanced vasa vasorum neovascularization in experimental hypercholesterolemia. J. Clin. Invest. 101 : 1551, 1998*). L'hypertension artérielle expérimentale aboutit, elle aussi, à un accroissement de la néovascularisation adventitielle impliquant la voie HIF-1 α / VEGF (*F. Kuwahara et al. HIF-1 α / VEGF pathway for adventitial vasa vasorum formation in hypertensive rat aorta. Hypertension 39 : 46, 2002*).

Rôle de l'angiogenèse dans la formation et la progression de la plaque athéromateuse

L'hypothèse d'un rôle délétère de l'angiogenèse dans la progression de la plaque est étayée par une série d'arguments : 1) il existe une relation entre l'hémorragie dans la plaque d'athérome et l'importance des lésions d'athérosclérose. L'accumulation des membranes d'érythrocytes pourrait représenter un puissant stimulus athérogénique (*F. Kolodgie et al., Intraplaque hemorrhage and progression of coronary atheroma. New Engl. J. Med. 349 : 2316, 2003*) ; 2) de faibles doses de VEGF (2 μ g/kg) chez la souris athéromateuse augmentent le nombre des macrophages dans la moëlle osseuse et le sang circulant et accroissent la progression de la plaque (*F. Celetti et al., VEGF enhances atherosclerotic plaque progression. Nature Med. 7 : 425, 2001*) ; 3) un facteur tel que la nicotine induit à la fois une angiogenèse et une progression de la plaque athéromateuse qui lui est corrélée (*C. Heerschen et al., Nicotine stimulates angiogenesis and promotes tumor growth and atherosclerosis. Nature Med. 7 : 833, 2001*) ; 4) plusieurs stratégies anti-angiogéniques ont été utilisées avec succès pour limiter la progression de la plaque athéromateuse chez la souris hypercholestérolémique (souris déficiente en ApoE et soumise à un régime hypercholestérolémiant) : l'endostatine, le TNP-470, l'angiostatine limitent la progression de la plaque athéromateuse. Les inhibiteurs d'angiogenèse réduisent l'infiltration des cellules inflammatoires (macrophages) au niveau de la plaque (*K. Moulton, Circulation 99 : 1726, 1999 ; PNAS 100 : 4736, 2003*). L'inhibition du récepteur Flt-1 (VEGF-R1) du VEGF aboutit aussi à un ralentissement de la progression de la plaque, même s'il semble que cet effet soit attribuable à une réduction de la mobilisation des progéniteurs myéloïdes issus de la moëlle et à une baisse de l'infiltration de cellules inflammatoires dans la plaque plutôt qu'à un effet anti-angiogénique (*A. Lutun et al., Inhibition of atherosclerosis by anti-Flt-1. Nature Med. 8 : 831, 2002*).

En conclusion, la néovascularisation de la plaque est un élément critique de son expansion et de ses possibles complications (rupture, thrombose). Une surveillance à long terme des traitements angiogéniques nouvellement prescrits dans l'ischémie coronarienne ou des membres inférieurs s'impose. Les travaux expérimentaux montrant une efficacité d'un traitement anti-angiogénique dans la régression de la plaque soulèvent la question d'associer dans le futur un tel traitement à la thérapeutique classique de l'athérosclérose et de ses facteurs de risque.

Les PPARs (Peroxisome Proliferator-Activated Receptors) et leur rôle dans l'angiogenèse et l'athérome

Les PPARs sont des facteurs de transcription nucléaire impliqués dans le métabolisme lipidique (PPAR α) et glucidique (PPAR γ), la prolifération et la différenciation cellulaire. Ils exercent aussi un effet direct sur la paroi vasculaire : effet dans l'angiogenèse (PPAR γ) et surtout implication dans le développement et la progression de l'athérome (*S. Levastel et al., PPAR et paroi vasculaire. Médecine/Science 17 : 637, 2001*).

Le type d'action de PPAR γ dans l'angiogenèse est discuté. PPAR γ induit *in vitro* le VEGF dans les différentes cellules de la paroi vasculaire. Toutefois, *in vivo*, les thiazolidinediones (TZD), agonistes des PPAR γ , inhibent l'angiogenèse induite par le VEGF (*X. Xin et al., J. Biol. Chem. 274 : 9116, 1999*). De même, les agonistes de PPAR γ inhibent la croissance tumorale *in vivo* par un effet anti-angiogénique (*D. Panigrahy et al., J. Clin. Invest. 110 : 923, 2002*).

Les PPARs jouent un rôle important dans l'athérome : PPAR γ est exprimé dans les cellules endothéliales et musculaires lisses vasculaires, dans les macrophages. L'effet anti-athéromateux résultant de la stimulation de PPAR γ est lié à une série d'effets tant sur le plan systémique que local, notamment au niveau des macrophages (*G. Chinetti et al. Current Opinion in Lipidology 14 : 459, 2003*). La troglitazone, agoniste de PPAR γ , inhibe l'athérosclérose chez la souris ApoE $-/-$ hypercholestérolémique par amélioration de l'insulino-résistance alors même que le récepteur des LDL, CD36, est augmenté dans l'aorte et les macrophages (*Z. Chen et al., Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 21 : 372, 2001*). De même, le mécanisme de l'effet athéroprotecteur des agonistes PPAR γ chez la souris mâle déficiente en récepteur du LDL fait intervenir des phénomènes d'insulino-sensibilité et une diminution de l'expression de facteurs pro-inflammatoires au niveau de l'aorte (*A.C. Li et al., J. Clin. Invest. 106 : 523, 2000*).

Chez l'homme, il n'est pas encore possible de connaître l'effet potentiellement bénéfique anti-athéromateux de l'administration des TZDs, même si ces produits augmentent l'insulino-sensibilité du diabète de type 2. Des mutations partiellement inactivatrices de PPAR γ chez l'homme sont responsables de syndromes en miroir de la stimulation de PPAR γ : lipodystrophie, insulino-résistance, hypertension (*M. Gurnell et al., JCEM 88 : 2412, 2003*).

PPAR α , comme PPAR γ , est exprimé dans les différentes cellules de la paroi vasculaire et les macrophages. Les agonistes de PPAR α , les fibrates, ont montré leur efficacité dans la prévention secondaire des affections cardiovasculaires. L'inactivation génique de PPAR α conduit, de façon inattendue, à un effet athéro-producteur vraisemblablement lié à une amélioration de l'insulino-résistance et à une baisse de la pression artérielle (K. Tordjman et al., *J. Clin. Invest.* 107 : 1025, 2001). En revanche, le fénofibrate réduit l'athérosclérose chez la souris ApoE -/- (H. Duez et al., *J. Biol. Chem.* 277 : 48051, 2002).

PPAR δ apparaît comme un agent pro-inflammatoire dans les macrophages, *in vitro* et *in vivo*. Toutefois, l'addition d'un ligand de PPAR δ a un effet anti-athérogénique chez la souris. L'explication de cette contradiction apparente résiderait dans le fait que PPAR δ , en l'absence de ligand exogène, lierait un répresseur anti-inflammatoire, BCL-6. BCL-6 exerce son effet anti-athérogène lorsque le ligand exogène de PPAR δ est administré et qu'ainsi BCL-6 est libéré (C.L. Lee et al., *Science* 302 : 453, 2003).

Système rénine-angiotensine et athérome

L'angiotensine II exerce plusieurs effets directs sur la paroi vasculaire. Elle est pro-angiogénique, cette action étant médiée par les récepteur AT₁ et sans doute aussi AT₂. Elle a par ailleurs une action pro-inflammatoire prononcée.

L'angiotensine II induit un anévrisme de l'aorte abdominale chez la souris Apo E -/-. L'angiotensine II, en association avec l'hyperlipidémie, provoque une réaction inflammatoire de l'aorte. L'effet semble spécifique de l'angiotensine II, la noradrénaline ne provoquant pas de lésions semblables (A. Daugherty et al., *J. Clin. Invest.* 105 : 2000 ; D. Weiss et al., *Circulation* 103 : 448, 2001). Les mécanismes mis en jeu sont multiples : recrutement et activation de monocytes/macrophages ; stimulation de facteurs de croissance, de cytokines matricielles pro-inflammatoires telles que l'ostéopontine (D. Bruemmer et al., *J. Clin. Invest.* 112 : 1318, 2003) et de facteurs de la coagulation tels que l'urokinase plasminogène activator (Y.X. Wang et al., *Am. J. Pathol.* 159 : 1455, 2001).

L'angiotensine II stimule la production de radicaux libres de l'oxygène (reactive oxygen species — ROS). L'action pro-inflammatoire de l'angiotensine II est aussi médiée par la production de ROS : l'hypertrophie vasculaire provoquée par l'angiotensine II est abolie par la surexpression de la catalase et par l'inhibition de l'oxidase NAD(P)H. L'effet de l'angiotensine II dans la génération des ROS implique l'activation de la PKC et de Rac, de façon séquentielle (P. Seshiah et al., *Circ. Res.* 91 : 406, 2002). La diminution du taux d'ACE chez la souris diminue à la fois le stress oxydatif et la progression de l'athérosclérose (T. Hayek et al., *Arterioscl. Thromb. Vasc. Biol.* 23 : 2090, 2003), ce qui montre les liens étroits entre le système rénine local et la production de ROS.

Rôle des statines dans l'angiogenèse et l'athérome

Les statines sont des inhibiteurs de 3-hydroxy-3 methyl-glutaryl co-enzyme A (HMG-CoA) réductase. Ces médicaments diminuent le cholestérol LDL et leur efficacité en prévention primaire et secondaire de la maladie coronaire a été largement prouvée. Leurs effets sont pléiotropiques : action anti-athéromateuse, anti-thrombotique et effet dans le domaine de l'angiogenèse. Cette action pléiotropique des statines est liée à la baisse du cholestérol et à la diminution de la prénylation de protéines cytosoliques qui doivent être ancrées dans la membrane pour assurer leurs effets. En outre, les statines favorisent la phosphorylation de Akt et accroît ainsi la production de NO (*J. Auer et al. Clinical significance of pleiotropic effects of statins. Curr. Med. Chem. 9 : 1831, 2002*).

Les statines accroissent la différenciation des progéniteurs des cellules endothéliales (PCE), *via* la voie PI3-kinase/Akt. Cet effet des statines, aussi efficace que celui du VEGF, peut contribuer à leur action bénéfique dans la maladie coronaire (*S. Dimmeler et al., JCI 108 : 391, 2001*) et à l'angiogenèse dans un modèle d'ischémie de la patte chez le lapin (*Kureichi Y. et al., Nat. Med. 6 : 1004, 2000*). Toutefois, l'effet des statines ne paraît pas se limiter à un seul effet angiogénique : les statines à doses élevées inhibent *in vitro* et *in vivo* l'angiogenèse dans différents modèles (*M. Weiss et al. Statins have biphasic effects on angiogenesis. Circulation 105 : 739, 2002*).

Le mécanisme d'action de l'effet angiostatique des statines semble indépendant de leur effet bénéfique hypocholestérolémiant. Il apparaît lié à une diminution de la prénylation des petites protéines G, telles que Rho. Le géranylgeranyl diphosphate (GGPP) est en effet capable de rétablir l'activité de Rho. La cérivas-tatine en inhibant la synthèse de GGPP inhiberait la translocation et l'activité de RhoA, conduisant à une désorganisation des fibres de stress et de l'architecture du cytosquelette. La voie de signalisation FAK/PI3-kinase/Akt serait, par voie de conséquence, inhibée (*L. Vincent et al., FEBS Letters 495 : 159, 2001 ; Thromb. Haemost. 89 : 530, 2003*).

Sur le plan anatomique, l'administration de statine préserve la vascularisation des coronaires chez le porc hypercholestérolémique (*S. Wilson et al., Circulation 105 : 415, 2002*).

En définitive, l'action bénéfique des statines dans la maladie athéromateuse s'explique par d'autres effets que leur seule action hypolipidémiant. Leur rôle dans l'angiogenèse — anti-angiogénique ou angiostatique, à doses élevées — pourrait être un élément important dans leur effet athéro-protecteur. Les statines inhiberaient la progression de la plaque athéromateuse en bloquant notamment les phénomènes d'angiogenèse qui lui sont associés.

RAPPORT D'ACTIVITÉ DU LABORATOIRE

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

Équipe : P. CORVOL, C. HUBERT, C. MONNOT, L. MULLER, G. NGUYEN, A. CAPPONI, M. GERVAIS-TAUREL, A. MICHAUD, L. LOVICONI, A. BARRET, C. ARDIDIE, E. ÉTIENNE

I-1. Enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE)

Les travaux du laboratoire sur l'enzyme de conversion de l'angiotensine se sont poursuivis dans plusieurs directions. Tout d'abord, nous avons complété l'étude phylogénétique de l'ACE grâce à une collaboration menée avec l'équipe du Pr D. Vieau (Univ. de Lille) sur le clonage, l'expression et la caractérisation de l'ACE chez un annélide, la sangsue. Nous avons ainsi mis en évidence pour la première fois chez un invertébré non-insecte un ACE dont les propriétés enzymatiques sont proches de celles des mammifères. L'expression de cet ACE dans l'appareil digestif de la sangsue et sa modulation au cours des différents repas suggèrent qu'il joue un rôle dans l'hydrolyse terminale des peptides lors de la digestion.

Par ailleurs, nous avons montré avec l'équipe du Dr K. Bernstein (Emory Univ., Atlanta, USA) que l'inactivation génique sélective du domaine N-terminal de l'ACE n'entraînait pas de phénotype particulier : la pression artérielle des animaux dont le domaine N-terminal a été inactivé au niveau des histidines liant le zinc du site catalytique et substitué à l'ACE sauvage par recombinaison homologue est indistinguishable des animaux sauvages. De même, aucune anomalie de développement rénal, d'hématopoïèse ou de fertilité n'a été noté. Un travail similaire portant sur l'inactivation génique sélective du domaine C-terminal suivi d'une étude chez l'animal après recombinaison homologue est en cours. Il sera ainsi possible de connaître pour la première fois, *in vivo*, la fonction de chacun des deux domaines de l'ACE.

I-2. Enzyme de conversion de l'endothéline

L'endothéline-1 est le plus puissant agent vasoconstricteur identifié à ce jour. Elle appartient à une famille de 3 peptides indispensables au cours du développement et qui régulent les systèmes cardiovasculaires et neuroendocrines par des mécanismes autocrines et paracrines. La biosynthèse et l'activation de ces peptides sont assurées par une enzyme spécifique : l'enzyme de conversion de l'endothéline (ECE). Les expériences d'inactivation des gènes codant pour l'ECE mettent en évidence l'importance de la biosynthèse locale de ces peptides. Par ailleurs, l'ECE est capable d'assurer l'activation des endothélines aussi bien au cours du processus sécrétoire que dans le milieu extracellulaire. Le contrôle local de la biosynthèse des endothélines par l'ECE joue un rôle d'autant plus fonda-

mental qu'il existe plusieurs isoformes de cette enzyme qui possèdent la même activité catalytique mais des profils d'expression subcellulaires spécifiques. La caractérisation des sites d'activité de ces enzymes est donc importante pour l'analyse du système endothéline et pour la mise au point d'inhibiteurs permettant le contrôle de ce système.

a) Trafic intracellulaire des isoformes de l'ECE

En plus de l'expression à la membrane plasmique, nous avons mis en évidence la concentration de certaines isoformes dans le système endosomal. Nous avons déjà pu montrer que l'hétérodimérisation des isoformes d'ECE-1 régule la distribution intracellulaire de l'enzyme, et par là-même de la biosynthèse extracellulaire d'endothéline (Muller *et al.*, 2003). Nous avons poursuivi cette analyse du trafic intracellulaire, notamment par des approches de microscopie confocale sur cellules vivantes telles que le FRAP (fluorescence recovery after photobleaching). Ces travaux nous ont permis de caractériser chacune des isoformes de la membrane plasmique. Nous avons ainsi identifié : — les signaux d'adressage de leur domaine cytosolique responsables de leur internalisation et recyclage ; — les mécanismes de régulation de ce trafic par la phosphoinositide-3-kinase et la protéine kinase C (manuscrit soumis pour publication).

Nous complétons ces travaux par l'identification de protéines associées aux domaines cytosoliques des ECE par des approches biochimiques basées sur l'interaction *in vitro* de domaines cytosoliques recombinants avec des cytosols de cellules endothéliales. Ces interactions seront analysées par une approche protéomique, gels bi-dimensionnels suivis de spectroscopie de masse.

b) Nouvelles fonctions de l'ECE dans la voie d'endocytose

La présence d'ECE dans les endosomes suggère de nouvelles fonctions pour cette endopeptidase, dans la mesure où son substrat principal, la big-endothéline, n'est pas présent dans les endosomes et parce que ces compartiments intracellulaires sont associés à la dégradation et non à la biosynthèse de peptides. La balance entre l'activation et la dégradation des peptides vasoactifs permet une régulation complexe du système cardiovasculaire. La dégradation de la bradykinine par l'ECE-1, décrite *in vitro*, pourrait permettre l'interaction directe entre le système endothéline et la bradykinine qui pourrait se faire dans un contexte extracellulaire semblable à celui de la dégradation de la bradykinine par l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE). D'autre part, la dégradation de ce peptide dans des endosomes pourrait constituer un nouveau type de régulation de la signalisation par la bradykinine. Nous étudions l'importance physiologique de cette voie de signalisation en collaboration avec le laboratoire du Pr Alhenc-Gelas (U367). De même, nous nous intéressons à la dégradation de la substance P par l'ECE et au rôle que celle-ci pourrait avoir dans la signalisation des récepteurs des neurokinines, en collaboration avec le Dr Roosterman de l'Université de Münster (Allemagne).

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

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

a) Implication de la voie de signalisation intracellulaire PI3K/Akt du récepteur de type 1 (AT₁) de l'angiotensine II dans les réponses prolifératives au cours des processus de remodelage vasculaire

L'Angiotensine II (AngII) participe au remodelage vasculaire associé aux maladies cardiovasculaires prolifératives, comme l'athérosclérose et la resténose post-angioplastie, en favorisant la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV) par l'intermédiaire du récepteur membranaire couplé aux protéines G, le récepteur AT₁. Parmi les mécanismes moléculaires impliqués dans cet effet mitogénique, nous avons identifié la voie de signalisation de la PI3K (phosphoinositide 3-kinase) et de la sérine/thréonine kinase Akt, en cellules CHOAT1 et en CMLV. Dans ces deux modèles cellulaires, l'activation de la voie endogène PI3K/Akt en réponse à l'AngII s'effectue indépendamment de celle de la cascade des ERK1 et ERK2. De plus, la stimulation de ces deux voies est nécessaire à la prolifération cellulaire induite par l'AngII.

Cependant, la surexpression de la sérine/thréonine Akt dans des cellules CHO exprimant le récepteur AT₁ est responsable d'une abolition de la réponse proliférative à l'AngII de ces cellules. Cette abolition de la réponse proliférative est liée à la perte d'accumulation nucléaire des MAP kinases ERK1/2. Pourtant, aucune interaction moléculaire directe Akt/ERKs n'a été rapportée. En revanche, PEA-15, (phosphoprotéine enrichie dans les astrocytes, d'un poids moléculaire de 15 kDa) protéine ubiquitaire, pourrait médier l'effet de la surexpression d'Akt sur la rétention cytosolique des ERK1/2. En effet, PEA-15 est, d'une part, une ancre cytosolique des ERK1/2 et, d'autre part, un substrat phosphorylé par Akt. Afin d'étudier la contribution de PEA-15 par l'inhibition des ERK1/2 dans la réponse proliférative induite par l'AngII, nous avons établi une collaboration avec l'équipe d'Hervé Chneiweiss (INSERM U114).

Ce travail a permis de montrer l'implication de PEA-15 comme médiateur des effets de la surexpression d'Akt sur la localisation des ERK1/2 dans la lignée CHO AT_{1A} par mise en évidence d'une interaction Akt/PEA-15. Nous avons montré que la stabilisation de PEA-15 par Akt activé s'accompagne d'une augmentation de la quantité de PEA-15, susceptible d'expliquer la perte d'accumulation nucléaire des ERKs par surexpression d'Akt. Nous avons observé que la surexpression d'Akt ou de PEA-15 s'accompagne d'une déphosphorylation plus lente des ERK1/2 après leur activation en réponse à l'AngII.

L'ensemble de ces travaux montre l'existence d'une interaction originale entre les voies PI3K/Akt et ERKs, intervenant dans la modification de la réponse proliférative et fait l'objet d'un manuscrit en cours de préparation.

De plus, il nous a semblé intéressant d'analyser si ces interactions entre Akt, PEA-15 et ERK1/2 pouvaient intervenir dans d'autres cibles cellulaires de l'AngII et par conséquent modifier d'autres réponses physiologiques à cette hormone. Pour cela, nous développons un travail collaboratif avec le Professeur Alessandro Capponi (Division d'endocrinologie, Département de médecine interne, Faculté de médecine, Genève, CH), qui travaille actuellement dans notre laboratoire. Ainsi, nous avons montré qu'il existe une corrélation positive entre la quantité d'Akt actif et la quantité de PEA-15 dans les cellules corticosurrénales sécrétrices d'aldostérone (CSA) H295R. De plus, l'abolition de l'activité d'Akt s'accompagne d'une augmentation de la sécrétion d'aldostérone de ces CSA. Ces deux observations pourraient être liées. En effet, l'activité nucléaire des ERK1/2 est déterminante pour la biosynthèse d'aldostérone des CSA en réponse à l'AngII. Dans les cellules H295R, l'élévation de la sécrétion d'aldostérone par abolition de l'activité d'Akt pourrait être liée en partie à une augmentation de l'activité nucléaire des ERK1/2 résultant d'une diminution de la quantité de PEA-15. Les interactions Akt/PEA-15/ERKs seraient donc également susceptibles de moduler les réponses des CSA à l'AngII.

Ce travail permettra une meilleure compréhension des interactions moléculaires entre la voie PI3K/Akt et la cascade des MAPK ERK1/2 ainsi que des conséquences physiopathologiques de la surexpression de l'Akt dans la genèse de l'hypertension artérielle. Ces mécanismes d'interactions fonctionnelles, encore mal connus, doivent être clairement disséqués afin de mieux connaître les régulations mises en jeu dans de nombreuses pathologies présentant de hauts niveaux d'expression de l'Akt, de l'hypertension artérielle à certains cancers.

b) Analyse structure-fonction de la protéine Angiopoietin-like 4 en cellules endothéliales et cellules musculaires lisses vasculaires

Ce thème de recherche est réalisé en collaboration avec l'équipe du Dr Stéphane Germain, dans le cadre de la recherche de nouveaux acteurs de l'angiogénèse hypoxique/ischémique. Cette équipe a cloné la protéine Angiopoietin-like 4 (ANGPTL4) par criblage différentiel entre ARN messagers de cellules micro-endothéliales humaines (HMEC-1) soumises à une hypoxie, puissant inducteur d'angiogénèse, et ARNm des mêmes cellules cultivées en normoxie.

Plusieurs lignées eucaryotes stables sécrétant la protéine ont été établies. L'analyse du milieu conditionné a permis de mettre en évidence l'existence de deux formes sécrétées : la protéine entière (environ 50 kDa) et un fragment c-terminal (35 kDa). De plus, certains facteurs de croissance interagissent avec la matrice extracellulaire, régulant leur biodisponibilité. Nous avons recherché une interaction de ce candidat angiogénique avec la matrice, en réalisant des préparations

de matrice étudiées par Western blot et en microscopie confocale. Nous avons observé une association à la matrice extracellulaire de la forme longue de la protéine recombinante dans les lignées transfectées (CHO, HEK). Cette interaction forte semble indépendante des héparanes sulfates, car elle est reproduite dans des lignées de CHO déficientes. Nous avons également étudié la protéine endogène en Western blot grâce à des anticorps polyclonaux réalisés au laboratoire. Dans les différents modèles cellulaires vasculaires étudiés (cellules endothéliales humaines en lignée établie ou culture primaire, cellules de muscle lisses vasculaire humaines ou de rat), la protéine endogène est retrouvée associée à la matrice extracellulaire. L'hypoxie entraîne une accumulation d'*Angptl4* dans le milieu de culture et la matrice des cellules endothéliales.

Nos résultats montrent que la protéine ANGPTL4 subit une protéolyse aboutissant à la formation d'au moins 2 fragments dans le milieu de culture, et dont la biodisponibilité est modulée par une forte affinité pour la matrice de la protéine entière. L'importance biologique de cette concentration péricellulaire, et l'activité de cette forme matricielle sont en cours d'étude.

De plus, ANGPTL4 comme les autres angiopoïétin-like possède un domaine coiled-coil N-terminal et un domaine fibrinogène-like C-terminal. Le rôle spécifique de ces deux domaines fonctionnels dans les interactions protéine-matrice, protéine-cellules, dans la transduction du signal ou dans l'activité biologique est en cours d'étude. En particulier, des surexpressions stables (CHO, HEK) ou transitoires (COS7) du domaine coiled-coil de la protéine ANGPTL4 ont été réalisées. Ce travail permettra de mieux connaître les régions fonctionnelles de cette protéine pouvant être impliquées dans le remodelage vasculaire.

II — HORMONES PEPTIDIQUES : ONTOGÈNE ET RÔLE DANS LE DÉVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE ET L'ANGIOGÈNE

Équipe : J.M. GASC, S. GERMAIN, N. LAMANDÉ, E. LARGER, M. BRAND, F. VINCENT, K. SAVARY, G. SINH, S. LE JAN, M.T. MORIN, I. QUEGUINER, J. PHILIPPE, A. GALAUP, E. LE COZ, C. ZOUKOURIAN

Dans le grand thème « Angiogenèse Physiopathologique et Embryonnaire », seuls les sujets de recherche qui ont connu des développements suffisants pour permettre la publication de résultats sont résumés dans ce chapitre. D'autres sujets moins avancés seront rapportés dans un prochain annuaire.

1. Les lésions vasculaires chez les patients diabétiques font partie du tableau clinique et, à ce jour, les traitements dont on dispose, sont très insuffisants. Afin de mieux comprendre les causes des mécanismes défectueux de l'angiogenèse dans ces conditions, nous avons mis au point un modèle expérimental d'hyperglycémie dans l'embryon de poulet.

2. L'ischémie critique des membres inférieurs constitue une complication fréquente du diabète et se rencontre aussi dans d'autres pathologies, notamment

cardiovasculaires. Ces pathologies entraînent une oblitération des gros vaisseaux et malgré les efforts pour stimuler une revascularisation, le plus souvent il faut recourir à l'amputation. Nous avons étudié l'expression des facteurs de croissance et de transcription liés à l'angiogenèse et il apparaît que ce n'est pas tant un défaut de facteurs pro-angiogéniques mais plus probablement une surexpression de deux facteurs anti-angiogéniques, la thrombospondine 1 et l'angiotensinogène, qui pourraient jouer un rôle dans le défaut de production de vaisseaux collatéraux.

3. Poursuivant notre investigation sur les propriétés anti-angiogéniques de la molécule d'angiotensinogène, nous avons documenté les propriétés antitumorales de cette protéine dans deux modèles différents de souris porteuses de tumeurs.

4. Le rôle possible de l'angiotensinogène *in vivo* sur la formation des vaisseaux a été examiné en comparant la paroi vasculaire des souris avec une surexpression ou un défaut d'expression de l'angiotensinogène.

5. Enfin, nous avons poursuivi nos travaux sur l'angiopoïétine-like 4 (ANGPTL4), une molécule induite par l'hypoxie et jouant un rôle important en angiogenèse et tumorigenèse.

II-1. Hyperglycémie et angiogenèse dans l'embryon de poulet

Le diabète est un syndrome qui admet de multiples causes, dont le point commun est l'hyperglycémie chronique. Les conséquences à long terme du diabète sont vasculaires et l'hyperglycémie chronique en est directement responsable comme l'ont démontré les études d'intervention sur la glycémie. Les dégâts vasculaires provoqués par l'hyperglycémie chronique sont responsables, à long terme, d'une ischémie tissulaire. Chez l'adulte non diabétique, l'ischémie tissulaire déclenche une série d'événements aboutissant à la formation et à la maturation de vaisseaux sanguins de suppléance, néovaisseaux, et à l'ouverture de vaisseaux collatéraux.

Le patient diabétique est exposé au long terme à deux destins opposés : une angiogenèse excessive au niveau de la rétine, et une angiogenèse déficiente en réponse à une ischémie myocardique ou des membres inférieurs.

Nous avons mis au point un modèle d'étude des effets de l'hyperglycémie sur le développement vasculaire. Ce modèle est une adaptation, en hyperglycémie, d'un modèle classique d'étude de l'angiogenèse, la membrane chorioallantoïdienne de poulet. Dans ce modèle, l'hyperglycémie inhibe l'angiogenèse. Cet effet est la conséquence d'un effet direct, modeste, pro-apoptotique, d'un effet plus marqué d'inhibition de la prolifération des cellules endothéliales, tous deux déjà décrits *in vitro*. Dans le modèle de la membrane chorioallantoïdienne de poulet, l'expression des principaux facteurs de croissance vasculaire (FGF-2, VEGF, angiopoïétine 1 et 2, et les récepteurs du VEGF et des angiopoïétines), que nous avons étudiés par quantification des ARNm par RT-PCR, et par hybridation *in situ* est normale. Nous cherchons à corriger les défauts observés dans

le modèle de la CAM. Le premier temps de l'intervention thérapeutique, actuellement en cours de mise au point, consiste en l'administration de traitement visant à diminuer le stress oxydant.

II-2. Facteurs pro- et anti-angiogéniques dans les membres inférieurs lors de l'ischémie critique

L'ischémie critique des membres inférieurs se caractérise par une perte des petits capillaires qui assurent l'apport en oxygène et en nutriments aux fibres musculaires. Cette diminution de la densité capillaire place le muscle en état d'ischémie qui devrait amorcer spontanément un programme de revascularisation. Le plus souvent cette revascularisation ne se produit pas. Pour expliquer ce défaut, nous avons entrepris une étude de l'expression des facteurs de croissance et de transcription dans le tissu musculaire strié sain et ischémique. La comparaison entre le prélèvement distal qui a déjà subi les effets de l'ischémie et la zone saine, au niveau de l'amputation montre que les facteurs caractéristiques de l'angiogenèse (le VEGF et ses récepteurs, les composants du système des endothélines, les angiopoïétines, etc.), continuent d'être exprimés normalement. Mais, par ailleurs, nous avons trouvé que deux molécules possédant des propriétés anti-angiogéniques sont exprimées exclusivement dans la partie ischémique : la thrombospondine 1 (chez tous les patients) et l'angiotensinogène chez la moitié d'entre eux. Cette expression paradoxale de ces deux facteurs anti-angiogéniques pourrait compromettre le développement d'une circulation collatérale.

II-3. Angiotensinogène : effets sur la croissance tumorale *in vivo*

Afin de tester *in vivo* les propriétés anti-angiogéniques de l'angiotensinogène (AGT), une construction adénovirale comprenant le cDNA de l'AGT a été utilisée pour infecter un nodule tumoral formé par greffe de cellules MDA chez la souris nude. Lorsque cette construction est injectée dans le nodule tumoral, il y a production d'AGT par les cellules infectées. Cette production d'AGT conduit en quelques jours à la disparition totale des vaisseaux de l'hôte qui avaient envahi le nodule. Dès trois jours après l'infection, les vaisseaux commencent à régresser et 10 jours après infection 7 nodules sur 8 ne sont plus constitués que par des cellules nécrosées : la régression de la tumeur, causée par insuffisance de nutriment et d'oxygène, est totale. Lorsque les cellules tumorales sont infectées en culture avant d'être greffées sur la souris, aucun nodule ne se forme. L'AGT produit par l'infection exerce donc un puissant effet anti-angiogénique paracrine. Un autre modèle expérimental murin a confirmé cet effet de l'AGT sur la croissance tumorale. Des cellules de mélanome sont injectées à des souris C57Black6 d'une lignée transgénisée avec le cDNA de l'AGT humain. Cette lignée de souris a un niveau d'AGT humain circulant de 50 à 100 supérieure à la concentration d'AGT endogène, mais présente une pression artérielle normale car la rénine de souris ne clive pas l'AGT humain. Cette lignée diffère donc des souris du groupe

contrôle seulement par la très forte concentration d'AGT. Lorsque ces souris reçoivent des cellules de mélanome, préalablement cultivées *in vitro*, il se forme très peu de nodules métastatiques tandis que les souris témoins développent de nombreuses tumeurs pulmonaires.

Dans ces deux modèles expérimentaux, l'AGT exerce un puissant effet inhibiteur sur la croissance des tumeurs, probablement par l'intermédiaire de la régression des cellules endothéliales.

II-4. Angiotensinogène : un modulateur de l'épaisseur de la paroi artérielle dans le rein

Récemment, nous avons montré que l'angiotensinogène possède des propriétés anti-angiogéniques qui se manifestent aussi bien sur des cellules endothéliales en culture que dans des modèles *in vivo*. Si l'angiotensinogène exerce un effet sur les cellules endothéliales on peut prédire que cette molécule intervient dans le remodelage de la paroi artérielle dans le rein et module la croissance de la paroi artérielle.

En effet, dès que les premières souris dépourvues d'AGT ont été étudiées, il est apparu qu'elles présentaient un épaississement (+ 65 %) de la paroi des artérioles dans le rein. Inversement, les souris transgénisées avec le cDNA de l'AGT humain présentent un amincissement de la paroi artérielle dans le rein. De même, un amincissement (- 20 %) est observé si l'excès d'AGT résulte d'une infection de la souris avec une construction adénovirale (collaboration avec M. Perricaudet et C. Bouquet, IGR, Villejuif). De façon surprenante cet effet de l'excès ou de l'absence d'AGT n'est observé que dans le rein et non dans le tissu adipeux, le foie ou le mésentère. Par ailleurs nous avons montré que AGT est un régulateur négatif du PDGF-B et de son récepteur le PDGF-R β .

II-5. Rôle de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE) dans l'érythropoïèse primitive chez le poulet

Diverses études ont mis en évidence le rôle du système rénine-angiotensine dans l'hématopoïèse chez l'adulte, mais son rôle dans l'hématopoïèse embryonnaire n'a pas été étudié. Nous avons donc entrepris d'examiner l'expression des divers composants du système rénine-angiotensine (SRA) et de mettre en évidence leur rôle dans le développement embryonnaire précoce. Cette étude a d'abord été réalisée chez l'embryon de poulet qui présente l'avantage d'être facilement accessible à tous les traitements pharmacologiques et d'être indépendant des influences maternelles.

La première partie du travail a consisté en l'étude de l'ontogenèse de l'ACE, une enzyme clef du SRA, au cours du développement embryonnaire. Cette étude a permis de mettre en évidence une expression très précoce de l'enzyme, dès les premières heures du développement (stade HH4, de Hamburger et Hamilton).

Par hybridation *in situ* et immunohistochimie, nous avons localisé l'ACE dans l'endoderme extra-embryonnaire. Des dosages d'activité enzymatique ont confirmé que l'ACE est fonctionnelle dès ce stade. Par ailleurs, l'étude du patron d'expression de l'ACE au cours des 2 premiers jours du développement a mis en évidence une corrélation spatio-temporelle entre l'apparition progressive de l'ACE dans la région caudale de l'aire extra-embryonnaire et la différenciation des premiers îlots sanguins à ce niveau. Ceci suggère donc un rôle de l'enzyme dans l'érythropoïèse primitive provenant de la différenciation de ces îlots sanguins.

Nous avons parallèlement étudié l'expression concomitante des autres éléments du SRA en hybridation *in situ*. Pour cela nous avons cloné chez le poulet les cDNAs de l'angiotensinogène et de la rénine. Au moment où se différencient les îlots sanguins (stade HH8), l'angiotensinogène est exprimé dans l'endoderme et dans le mésoderme extra-embryonnaire, tandis que la rénine et le récepteur de l'angiotensine II sont exprimés dans le mésoderme.

Pour tester le rôle de ce système au cours de l'érythropoïèse primitive, nous avons traité des embryons avec un inhibiteur de l'ACE, le fosinoprilate, qui inhibe efficacement l'ACE de poulet. Lorsque l'inhibiteur est appliqué sur l'aire postérieure extra-embryonnaire au stade HH11, une diminution de 15 % de l'hématocrite est observée, après 48 heures de traitement. Cet effet dépend de l'angiotensine II, car l'application d'un antagoniste spécifique du récepteur de l'angiotensine II, dans les mêmes conditions, entraîne une diminution identique de l'hématocrite.

Ces résultats montrent donc une expression très précoce de tous les éléments du SRA dans le sac vitellin de l'embryon, tandis que les îlots sanguins se différencient. Ils mettent également en évidence un rôle du SRA dans la modulation de l'érythropoïèse primitive, effet dépendant de la production d'angiotensine II.

II-6. Régulation de l'expression des gènes par l'hypoxie et angiogenèse pathologique

Moduler l'angiogenèse, la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux préexistants, semble être une approche thérapeutique prometteuse dans de nombreuses situations pathophysiologiques, notamment dans les cancers et les ischémies cardiovasculaires. L'hypoxie est un stimulus majeur de l'angiogenèse et l'objectif de ce projet est la recherche de nouveaux mécanismes moléculaires impliqués dans l'hypoxie cellulaire ou tissulaire ainsi que dans l'angiogenèse réactionnelle. Cette étude a été initiée par criblage différentiel des ARNm de cellules endothéliales soumises à un stress hypoxique par rapport aux mêmes cellules cultivées en condition témoin (normoxie), par cDNA Representational Analysis (cDNA RDA). Trois cent cinquante gènes dont l'expression est induite par l'hypoxie ont déjà été identifiés.

Ce criblage nous a permis d'identifier un nouveau membre de la famille des angiopoïétines, l'**Angiopoietin-like 4 (ANGPTL4)**. Nous avons montré que l'expression de ce gène est induit par l'hypoxie dans les cellules endothéliales. De plus, dans un modèle d'angiogenèse *in ovo*, la greffe de cellules CHO surexprimant ANGPTL4 sur la membrane chorio-allantoïde de l'embryon de poulet est à l'origine d'une forte réponse angiogénique. En pathologie humaine, l'ARNm d'ANGPTL4 est exprimée spécifiquement dans les cellules tumorales des cancers conventionnels du rein (ou à cellules claires) pour lesquels ce gène consitue un marqueur diagnostique.

En pathologie cardiovasculaire, ANGPTL4 est exprimé dans les régions ischémiques chez les patients atteints d'ischémie critique des membres inférieurs ainsi que dans le cœur ayant subi une ischémie. Nous développons actuellement des modèles *in vivo* et *in vitro* pour caractériser le rôle d'ANGPTL4 dans les processus tumoraux et angiogéniques et de nouveaux outils afin de transférer le diagnostic du cancer du rein à cellules claires par immunomarquage anti-ANGPTL4, vers la clinique.

En collaboration avec Sanofi-Synthélabo, nous travaillons sur la recherche de nouvelles cibles thérapeutiques à partir de molécules impliquées dans l'angiogenèse et dans le développement du système nerveux. Enfin, dans le cadre d'un réseau INSERM dédié à l'étude des cellules souches, nous étudions le transcriptome de progéniteurs endothéliaux circulants par rapport aux cellules endothéliales adultes.

III — NEUROPEPTIDES CENTRAUX, RÉGULATION HYDRIQUE ET CARDIOVASCULAIRE

Équipe : C. LLORENS-CORTES, A. LE GOAZIGO-REAUX, N. PICCO, A. HUS-CITHAREL, R. ROZENFELD, S. EL MESSARI, C. CLAPERON

III-1. Le Système rénine-angiotensine (SRA) cérébral

Nous avons : 1) montré dans le cerveau, que l'aminopeptidase A (APA) et l'aminopeptidase N, étaient respectivement impliquées dans le métabolisme de l'angiotensine (Ang) II et de l'AngIII ; 2) développé les premiers inhibiteurs spécifiques et sélectifs de l'APA, inexistant jusqu'à ce jour, grâce à la connaissance de son site actif déduite du 1^{er} modèle 3D de l'APA et du test de banques de pseudopeptides ; 3) identifié que le peptide effecteur du SRA cérébral est l'AngIII et non l'AngII, comme établi à la périphérie. L'AngII augmente la sécrétion de vasopressine (AVP) et exerce un effet stimulateur tonique sur le contrôle central de la pression artérielle (PA). Ainsi le blocage central et non systémique de l'APA diminue fortement la PA chez le rat hypertendu, suggérant que l'APA cérébrale constituerait une nouvelle cible thérapeutique pour le traitement de l'hypertension artérielle (HTA). Notre projet consiste à développer de nouveaux inhibiteurs de l'APA, puissants et sélectifs capables de passer la bar-

rière hématoencéphalique après administration par voie orale, comme antihypertenseurs centraux. Le modèle 3D de l'APA nous aidera à définir un pharmacophore d'inhibiteur de l'APA. Les molécules produites seront évaluées pour leur capacité à inhiber l'APA, à bloquer le SRA cérébral et à diminuer la PA dans différents modèles animaux d'HTA expérimentale.

III-2. Recherche de ligands endogènes de récepteurs orphelins présents dans le SNC

En recherchant un récepteur spécifique de l'AngIII nous avons isolé un récepteur couplé aux protéines G (RCPG) partageant 31 % d'identité de séquence avec AT₁ et 90 % avec le récepteur orphelin humain APJ. Ce récepteur ne lie pas les angiotensines, représentant un RCPG orphelin. Ceci nous a conduit à développer un nouveau procédé de criblage original pour l'identification de ligands endogènes de RCPGs orphelins mettant à profit la propriété qu'ont la plupart des RCPGs de s'internaliser sous l'action de ligands agonistes. Notre projet consiste à appliquer ce procédé à la recherche de ligands endogènes de RCPGs orphelins localisés dans le SNC, dans des structures impliquées dans la régulation hydrique et cardiovasculaire. Dans le cadre d'une Alliance avec l'INSERM U413 et l'Institut de recherche Servier, une nouvelle séquence peptidique RFrame, ligand endogène du RCPG103 vient d'être isolée et est en cours de caractérisation. Parallèlement, un autre RCPG orphelin est en cours de désorphanisation (plusieurs étapes de purification restent à faire pour isoler et séquencer son ligand endogène).

III-3. Étude d'un nouveau neuropeptide, l'apéline

Fin 1998, le ligand endogène du récepteur APJ a été isolé, il s'agit de l'apéline, un peptide de 17 acides aminés (K17F). Nous avons : 1) montré que le récepteur que nous avons cloné est couplé négativement à l'adénylate cyclase et s'internalise sous l'action de K17F, l'identifiant au récepteur murin de l'apéline ; 2) établi pour la première fois dans le cerveau de rat la distribution des neurones apélinergiques et des ARNms du récepteur de l'apéline qui sont notamment exprimés par les neurones vasopressinergiques) du noyau supraoptique ; 3) mis en évidence que l'apéline injectée par voie i.c.v. diminue la sécrétion de vasopressine (AVP) et le comportement dipsique induit par la déshydratation, alors qu'injectée par voie i.v., elle diminue la PA. Notre projet s'oriente vers des études structure-fonction de l'apéline et de son récepteur utilisant une approche pharmacologique (Ala-Scan, test d'une chimiothèque : technique du FRET, Société Euroclide) et structurale (modèle 3D, Coll. avec l'U413 et l'UMR7565) nécessaires au développement d'agonistes ou d'antagonistes. Nous poursuivrons l'étude du rôle physiologique de l'apéline dans le SNC : 1) en identifiant *in vivo* les fragments d'apéline produits dans le cerveau et le plasma (purification par HPLC + RIA) ; 2) en établissant la distribution de l'apéline et de son récepteur dans le cerveau

humain (coll. avec le Pr M. Palkovits) ; 3) en approfondissant le rôle de l'apéline dans le contrôle de l'homéostasie hydrosodée et des fonctions cardiovasculaires. Pour cela, nous étudierons si l'apéline est colocalisée avec l'AVP, si elle inhibe l'activité électrique des neurones AVP, si injectée au niveau central, elle induit une diurèse de par son inhibition sur la sécrétion d'AVP, ainsi l'apéline représenterait un antagoniste naturel de l'effet antidiurétique de l'AVP. Une investigation chez l'homme, en mesurant les taux plasmatiques d'apéline chez des patients présentant des taux plasmatiques d'AVP variables, permettra de progresser dans cette voie.

IV — GÉNÉTIQUE ET CLINIQUE DE L'HYPERTENSION ARTÉRIELLE

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

L'hypertension artérielle (HTA) représente l'exemple même d'une maladie complexe, soumise à de multiples facteurs génétiques et environnementaux divers. Une des particularités des approches que nous mettons en œuvre est la complémentarité entre les équipes clinique et génétique de l'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 (réseau Européen EURNETGEN) et secondaire (fibrodysplasie rénale, hyperaldostéronisme), de collection de tumeurs de la surrenales (phéochromocytomes), de même que focaliser une partie de nos études sur des formes rares héréditaires d'HTA. Une des découvertes importantes est l'identification de 2 gènes (WNK1 et WNK4) appartenant à une nouvelle famille de sérine/thréonine kinases, qui sont impliqués dans l'hypertension artérielle hyperkaliémique familiale (syndrome de Gordon).

Une grande partie des activités et des projets de l'équipe est maintenant tournée vers l'étude de la régulation de l'expression de ces gènes *in vitro* et *in vivo*, la création de modèles animaux transgéniques, la recherche de partenaires de ces gènes. Nous avons également caractérisé une nouvelle entité de pathologie vasculaire héréditaire, associant anévrisme de l'aorte ascendante et persistance du canal artériel et avons proposé le concept d'artériomyopathie.

Le deuxième axe de notre équipe concerne la susceptibilité génétique aux phéochromocytomes, tumeurs de la médullosurrénale entraînant des hypertension artérielles sévères et paroxystiques. Nous avons mis en évidence les relations entre gènes du complexe II mitochondrial (SHDH, SHDB), perte d'activité enzymatique, stimulation de l'angiogenèse et tumorigenèse. Nous avons mis en place un réseau national sur les paragangliomes (PGL.NET) et initié plusieurs stratégies de recherche.

IV-1. Rôles de WNK1 et WNK4 dans l'hypertension artérielle

Le projet est axé sur l'Hypertension Hyperkaliémique Familiale (HHF), encore appelée syndrome de Gordon ou pseudohypoaldostéronisme de type II (PHA2), une forme autosomique dominante d'HTA. En 1997, l'étude par une équipe américaine de huit familles atteintes a permis d'identifier 2 régions à l'origine du trait sur les chromosomes 1 et 17, dont au moins une correspond également à une région identifiée dans l'HTA essentielle humaine. Nous avons caractérisé plusieurs familles françaises, confirmé la transmission autosomique dominante de la maladie, montré les liens entre les anomalies métaboliques (hyperkaliémie, hyperchlorémie, acidose métabolique) 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. Nous avons aussi montré le piège possible de l'analyse phénotypique de l'affection basée sur la seule présence d'une hyperkaliémie de transmission autosomique dominante, source de confusion possible avec une stomatocytose héréditaire déshydratée. 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.

Au cours de l'année 2002 et 2003, nous avons particulièrement la régulation de l'expression *in vitro* du gène WNK1. Ce gène est étendu sur plus de 150 kbp, comprend 28 exons et est à l'origine de deux transcrits d'environ 9.5 et 11 kb. L'expression de ces 2 isoformes est tissu-spécifique. Le transcrit long de WNK1 est préférentiellement exprimé dans le cœur, le muscle squelettique, le testicule et le cerveau, alors que le transcrit court est très largement majoritaire dans le rein, ceci de façon identique chez l'homme et la souris. Nous avons pu mettre en évidence deux promoteurs proximaux à l'origine de 2 transcrits d'ex-

pression ubiquitaire, et un promoteur rénal en amont d'un exon d'expression spécifiquement rénale. La présence de deux sites de polyadénylation, et la présence d'épissages alternatifs complète la panoplie des mécanismes à l'origine d'une grande variété de transcrits. Une des découvertes majeures est la présence d'un transcrit rénal sans activité kinase, très fortement exprimé dans le tube contourné distal, qui suggère comme activité principale de cette isoforme, un mécanisme d'interaction avec d'autres protéines (en particulier par le biais de mécanismes d'autoinhibition).

La création d'animaux génétiquement modifiés constitue l'outil indispensable d'analyse moderne de la fonction de ces gènes. Pour WNK4, nous avons débuté un projet de transgénèse classique en collaboration avec le MDC de Berlin (Dr M. Bader, Dr J. Bohlender), avec surexpression du gène dans le tubule rénal, en utilisant un promoteur spécifique du tubule distal rénal. Pour WNK1, une autre approche a été débutée dans notre laboratoire, basée sur la similarité de structure génique entre le gène humain et murin et sur la fonctionnalité présumée des délétions de l'intron 1 responsables de la pathologie humaine. L'idée est de reproduire chez la souris la délétion de l'intron 1, avec dans un premier temps la création de souris transgéniques porteuses d'un BAC murin WNK1 contenant plus de 50Kb en amont du promoteur et dans lequel ont été insérés des sites LoxP en 5' et 3' de l'intron 1. Le croisement de ces souris avec une lignée exprimant la CRE recombinase de façon constitutive permettra d'identifier les modifications d'expression de WNK1 par l'analyse de et du gène rapporteur nLacZ, marqueur sensible et résolutif. et constitue le pré-requis à la création d'un animal avec une inactivation constitutive ou conditionnelle de WNK1 (projet C Delalay, J Hadchouel). 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. La construction d'un BAC correspondant a été effectuée en 2003 par J. Hadchouel. Ce projet a été validé par le GIS-Institut des Maladies Rares et est effectué en collaboration avec l'Institut de la Clinique de la Souris (Strasbourg). Des souris hétérozygotes devraient être obtenues en fin d'année 2004.

L'ensemble de ces projets de transgénèse, devrait permettre d'obtenir un modèle de la pathologie humaine, de corrélér 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 par criblage du génome :
La collection de familles supplémentaires nous a permis tester la liaison entre les sujets atteints de trois familles et d'exclure les trois loci candidats déjà

connus. Nous avons ainsi montré que le PHA2 faisait intervenir au moins un quatrième locus. Nous avons poursuivi la caractérisation de 7 familles qui semblaient les plus intéressantes, tant sur le plan de leur phénotype que de leur informativité. 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 est actuellement en cours en collaboration avec le Centre National de Génotypage. Nous espérons l'identification primaire d'un nouveau locus responsable de la maladie au cours du dernier trimestre 2004.

IV-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 poursuivons 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. L'ADN de 450 sujets dans le cadre d'une étude de trios a ainsi été envoyée au CNG en juin 2004.

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

au phénotype de non-modulation. Une interaction entre les polymorphismes des gènes de l'AGT, de l'ACE et de CYP11B2 semblent prédire fortement cette sous-classe de sujets avec hypertension. 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) Analyse de relations génotypes-phénotypes
(Département de Génétique et CIC, HEGP)

Deux études originales ont débuté à partir des résultats obtenus au cours des dernières années. La première est une étude de pharmacogénétique effectuée chez des fratries hypertendues avec l'objectif de déterminer les déterminants de la réponse aiguë et chronique au candésartan, inhibiteur des récepteurs de l'angiotensine II. Cette étude, effectuée au CIC de l'HEGP, a inclus 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 initialement par un programme ACI en 2000 puis 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). L'étude clinique effectuée en 2003-4 confirme la relation entre polymorphisme génétique R35H et l'excrétion urinaire de kallikréine, montre l'influence du rythme nyctéméral et du régime sodé sur cette excrétion. Les modifications d'activité du système rénine angiotensine en fonction des modifications fortes de régime sodé et potassique ne sont pas altérées par la présence de la mutation R53H. Par contre, une altération de la réactivité vasculaire semble confirmer les résultats observés chez la souris avec inactivation constitutive de la kallikréine tissulaire (Azizi *et al.*, en préparation).

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

a) Phéochromocytomes et Hyperaldostéronismes primaires

Le phéochromocytome est une cause rare d'HTA secondaire. Plusieurs gènes sont connus pour être impliqués dans le déterminisme génétique dans des pathologies familiales avec parfois phéochromocytome (*Ret*, *VHL*, *NF1*) mais leur contribution dans le phéochromocytome sporadique est faible. Récemment, 2 gènes codant pour deux sous-unités (SDHD et SDHC) du complexe II de la chaîne respiratoire mitochondriale ont été identifiés comme responsables du paragangliome héréditaire ont été identifiés. Nous avons identifié chez une famille française, une nouvelle mutation non-sens du gène *SDHD*, la perte de l'allèle maternel normal expliquant que seul l'ADN paternel muté s'exprime au niveau tumoral. L'étude enzymatique réalisée sur le phéochromocytome par P. Rustin (A. Roetig, A. Munnich, INSERM U393) a révélé un effondrement complet de l'activité du complexe II comparée à l'activité normale du complexe II analysée chez 8 phéochromocytomes contrôles non porteurs de la mutation. Par hybridation *in situ* et immunohistochimie, J. Favier 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. Notre recherche, soutenue par un contrat OBJECTIF INSERM, a pour *premier objectif* 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. À ce titre, nous avons récemment démontré le rôle pronostique (sévérité, localisation, récurrence, malignité) de mutations du gène *SDHB*. Nous poursuivons l'investigation d'autres gènes (prolyl hydroxylases en particulier) dans les paragangliomes héréditaires, tant sur le plan somatique que germlinal. 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 surrénalienne, phéochromocytome bénin ou malin, ...), prenant en compte le type et le site de mutation, et l'importance de la perte d'allèle associée. Notre *deuxième objectif* est d'identifier les mécanismes moléculaires qui font le lien entre mutations *SDHs* et tumorigenèse. L'étude de ces mécanismes sera effectuée dans un premier temps à l'aide de modèles cellulaires avec la recherche de i) l'accumulation de succinate et de 2-OG, ii) l'altération de l'activité des PHD, iii) leur conséquence sur la stabilisation des HIFs et iv) le rôle de cette stabilisation des HIFs dans la tumorigenèse des cellules chromaffines. Dans un 2^e temps, nous voulons développer un modèle animal de phéochromocytome qui serait un outil unique d'étude physiopathologique de la maladie humaine. Pour ce faire, nous avons entrepris une inactivation conditionnelle du gène *SDHB*, dans le cadre d'un projet en partie financé par le GIS-Maladies

rares, et effectué en partenariat avec l'ICS de Strasbourg. Nous devrions obtenir les premières souris hétérozygotes en fin d'année 2004.

La disponibilité au sein de la tumorothèque et DNAtèque COMÈTE (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 250 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, le CRB COMÈTE possède des informations cliniques et biologiques, une DNAtèque pour plus de 200 sujets avec hyperaldostéronisme primaire non tumoral et plus de 150 sujets avec adénomes de Conn (avec tumorothèque). Dans le cadre de l'ensemble des projets développés par le réseau COMÈTE, notre rôle sera de rechercher des familles avec hyperaldostéronisme et de tester des polymorphismes génétiques qui pourraient favoriser soit l'hyper-expression d'aldostérone, soit la tumorigenèse elle-même.

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

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

Pour la dysplasie fibromusculaire (DFM), artériopathie systémique d'origine inconnue, touchant les artères musculaires de moyen calibre en particulier les atteintes rénales et cérébrales, nous avons effectué depuis 1995-6 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. Plus de 250 cas de DFM ont été maintenant collectés dans le cadre d'une recherche clinique promue par l'INSERM (2001). Nous poursuivons l'analyse phénotypique de l'atteinte

vasculaire : des résultats importants ont été obtenus par échographie de haute résolution en collaboration avec l'unité 337 (S. Laurent : Projet financé par la Sté Française d'Hypertension Artérielle, promotion INSERM).

Nous avons également caractérisé une grande famille de la région Bourgogne souffrant d'une pathologie vasculaire aortique disséquante et d'un nombre anormalement important de persistance du canal artériel (Dr P. Khau Van Kien, service de Génétique de l'Hôpital de Dijon, PHRC régional 2001). L'analyse génétique initiale a permis d'exclure 8 gènes ou loci antérieurement connus ou suspectés dans les AAT/AD (COL3A1, FBN1, MFS2, 3p24-25, 5q13-q14 et 11q23.2-q24) et dans une forme particulière (Char syndrome, gène TFAP2B) et récessive de PCA (12q24). Nous avons par la suite effectué un criblage complet du génome à l'aide de 382 marqueurs répartis sur les 22 autosomes. L'analyse génétique restreinte aux sujets atteints a permis de mettre en évidence une localisation génétique unique pour les 2 phénotypes avec un LOD score multipoint > 4.0. L'analyse de marqueurs génétiques supplémentaires et la recherche d'haplotypes recombinants a permis de restreindre la région d'intérêt à 20cM. Le séquençage systématique des parties codantes de 5 gènes candidats positionnels a permis d'identifier le gène responsable de la pathologie. L'analyse immunohistologique de 2 pièces opératoires montrent les conséquences du défaut génétique sur la paroi aortique. Les sujets porteurs de la mutation, même s'ils sont asymptomatiques, ont une profonde altération de la compliance aortique évaluée par IRM.

Environ 20 % des anévrismes et dissections de l'aorte thoracique ascendante (AAT/DA) pourraient être familiaux. En dehors des syndromes de Marfan et d'Ehler-Danlos vasculaire, aucun autre gène n'a pour le moment été identifié comme responsable de cette pathologie hétérogène. La persistance du canal artériel (PCA) est une pathologie cardiovasculaire présente chez environ 1/2000 enfants et dont les mécanismes primaires intimes ne sont pas connus. L'identification de cette nouvelle entité physiopathologique artérielle vasculaire associant AAT/AD et PCA, devrait permettre d'éclairer d'un jour nouveau les mécanismes de ces 2 traits complexes.

V — ANGIOGENÈSE EMBRYONNAIRE ET PHYSIOPATHOLOGIQUE

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

V-1. Rôle des forces hémodynamiques dans l'établissement de l'identité artéro-veineuse des cellules endothéliales

Nos travaux récents ont montré que malgré l'expression sélective de certains gènes dans l'endothélium artériel ou veineux, il existe une plasticité considérable des CE au cours du développement normal chez l'embryon de poulet (Le Noble *et al.*, 2004). En effet, la manipulation expérimentale du flux sanguin permet de modifier l'expression de ces marqueurs : la ligature d'une artère vitelline pro-

voque l'arrêt du flux sanguin du côté distale de la ligature ; cette manipulation conduit à la disparition de l'expression des marqueurs artériels et à la transformation des artères en veines au cours d'une période de huit heures seulement. Si l'outil de ligature est enlevé, le sang peut re-perfuser l'artère et les marqueurs artériels sont ré-exprimés. Cette manipulation simple du flux sanguin permet donc la transformation d'une artère en une veine, aussi bien morphologiquement (la direction du flux sanguin change) que génétiquement (l'expression des marqueurs spécifique des artères et des veines change). En collaboration avec Vincent Fleury à l'École Polytechnique Orsay, nous avons démontré que la morphogenèse des vaisseaux était étroitement liée à l'auto-organisation du champ *hydrodynamique* à l'intérieur des vaisseaux, et du champ de contrainte à l'extérieur des vaisseaux. Nous avons développé un modèle donnant une description tendant vers le réalisme de la formation des vaisseaux sanguins du sac vitellin de l'embryon de poulet.

V-2. Relation système vasculaire-système nerveux

Les systèmes nerveux et vasculaire montrent des similarités anatomiques importantes. Plusieurs molécules intervenant dans le développement des deux systèmes ont été récemment identifiées, suggérant des mécanismes de contrôles communs dans le guidage et la prolifération des cellules endothéliales et neurales. Les récepteurs neuropilines (NRP-1 et NRP-2) interviennent en effet dans le guidage axonal ainsi que dans le développement vasculaire. Inversement, des facteurs trophiques cruciaux pour le développement vasculaire, notamment le vascular endothelial growth factor (VEGF), interviennent également au cours du développement neural et sont impliqués dans le développement de maladies neurodégénératives. Comprendre les mécanismes d'action de ces molécules dans le développement des deux systèmes neural et vasculaire favorisera le développement de thérapies nouvelles dans le traitement anti-angiogénique des cancers et dans la réparation des maladies neurodégénératives. Nous utilisons des modèles murins pour examiner : 1) le rôle d'un facteur de guidage axonal, nétrine-1, et de son récepteur, Unc5H2, dans le développement vasculaire ; 2) le rôle du facteur de croissance vasculaire VEGF-C dans le développement oligodendrocytaire et les maladies démyélinisantes ; 3) de produire des modèles transgéniques neuro-vasculaires afin d'étudier les interactions neuro-vasculaires au cours du développement.

V-3. Étude des précurseurs endothéliaux embryonnaires circulants

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

logique ou physiologique. Chez l'embryon, nous avons réalisé des parabioses caille-poulet et montré, en utilisant un marqueur spécifique des CE de caille, que ces cellules circulent et sont retrouvées dans de nombreux territoires embryonnaires mais toujours en faible nombre. Cependant, ces cellules sont mobilisables lors d'une angiogenèse expérimentale, la greffe d'un bourgeon de membre ou une blessure, par exemple, et participent alors en grand nombre au processus de néovascularisation requis.

LISTE DE PUBLICATIONS DU LABORATOIRE 2003-2004

2003

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ROZENFELD R., REAUX A., ITURRIOZ X., FASSOT C., FOURNIE-ZALUSKI M.C., DAVID C., MAIGRET B., ROQUES B.P., CORVOL P. and LLORENS-CORTES C. Amino-peptidase A, generating one of the main effector peptides of the brain renin-angiotensin system, angiotensin III, plays a key role in central control of blood pressure. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* 46 : 39-44, 2003.

DELALOY C., LU J., HOUOT A.-M., DISSE-NICODEME S., GASC J.-M., CORVOL P. and JEUNEMAITRE X. Multiple promoters in the WNK1 gene : one controls expression of a kidney-specific kinase-defective isoform. *Mol. Cell. Biol.* 23 : 9208-9221, 2003.

JACKSON R.S., CREEMERS J.W., FAROOQI J.S., RAFFIN-SANSON M.L., VARRO A., DOCKRAY G.J., HOLST J.J., BRUBAKER P.L., CORVOL P., POLONSKY K.S., OSTREGA D., BECKER K.L., BERTAGNA X., HUTTON J.C., WHITE A., DATTANI M.T., HUSSAIN K., MIDDLETON S.J., NICOLE T.M., MILLA P.J., LINDLEY K.J. and O'RAHILLY S. Small-intestinal dysfunction accompanies the complex endocrinopathy of human proprotein convertase 1 deficiency. *J. Clin. Invest.* 112 : 1550-1560, 2003.

KOSACHUNHANUN N., HUNT S.C., HOPKINS P.N., WILLIAMS R.R., JEUNEMAITRE X., CORVOL P., FERRI C., MORTENSEN R.M., HOLLENBERG N.K. and WILLIAMS G.H. Genetic determinants of nonmodulating hypertension. *Hypertension* 42 : 901-908, 2003.

GIMENEZ-ROQUEPLO A.P., FAVIER J., RUSTIN P., RIEUBLAND C., CRESPIN M., NAU V., KHAU VAN KIEN P., CORVOL P., PLOUIN P.-F. and JEUNEMAITRE X. Mutations in the SDHB gene are associated with extra-adrenal and/or malignant pheochromocytomas. *Cancer Res.* 63 : 5615-5621, 2003.

NISHIMURA H., YANG Y., HUBERT C., GASC J.M., RUIJTENBECK K., DE MEY J., BOUDIER H.A. and CORVOL P. Maturation-dependent changes of angiotensin receptor expression, in fowl. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 285 : R231-R242, 2003.

CORVOL P., LAMANDE N., CRUZ A., CELERIER J. and GASC J.M. Inhibition of angiogenesis : a new function for angiotensinogen and des (angiotensin I) angiotensinogen. *Curr. Hypertens. Rep.* 5 : 149-154, 2003.

COLE J.M., KHOKHLOVA N., SUTLIFF R.L., ADAMS J.W., DISHER K.M., ZHAO H., CAPECCHI M.R., CORVOL P. and BERNSTEIN K.E. Mice lacking endothelial ACE : normal blood pressure with elevated angiotensin II. *Hypertension* 41 : 313-321, 2003.

FUCHS S., PHILIPPE J., CORVOL P. and PINET F. Implication of Ref-1 in the repression of renin gene transcription by intracellular calcium. *J. Hypertens.* 21 : 327-335, 2003.

VANDERMEERSCH S., STEFANOVIC V., HUS-CITHAREL A., ARDAILLOU R., DUS-
SAULE J.-C. and CHANSEL D. AT₁ receptor expression in glomeruli from NO-
deficient rats. *Nephron Exp. Nephrol.* 95 : e119-e128, 2003.

ROZENFELD R., ITURRIOZ X., OKADA M., MAIGRET B. and LLORENS-CORTES C.
Study of glutamate 215 of aminopeptidase A by molecular modeling and site
directed mutagenesis : new insights into the catalytic mechanism of monozinc
aminopeptidases. *Biochemistry* 42 : 14785-14793, 2003.

CHARTREL N., DUJARDIN C., ANOUAR Y., LEPRINCE J., DECKER A., CLERENS S.,
DO-REGO J.C., VANDESANDE F., LLORENS-CORTES C., COSTENTIN J., BEAUVILLAIN
J.C. and VAUDRY H. Identification of 26RFa, a hypothalamic neuropeptide of the
RFamide peptide family with orexigenic activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*
100 : 15247-15252, 2003.

PONCET S., GASC J.-M., JANTZER R.C., MEYER S. and JUILLERAT-JEANNERET
L. Expression of Tie2 in human peripheral and autonomous nervous system.
Neuropathol. Appl. Neurobiol. 29 : 361-369, 2003.

HAMMAMI-HAMZA S., DOUSSAU M., ALLEMAND I., SEGRETAINE D., GASC J.-M.
and FINAZ C. 2P1, a novel male mouse cDNA specifically expressed during
meiosis. *Int. J. Dev. Biol.* 47 : 71-76, 2003.

FAURE S., DELALOY C., LEPRIVEY V., HADCHOUËL J., WARNOCK D.G., JEUNE-
MAITRE X. and ACHARD J.M. WNK kinases, ions distal tubular handling and
hypertension. *Nephrol. Dial. Transplant.* 18 : 2463-2467, 2003.

JEUNEMAITRE X. Polymorphisms of the renin angiotensin aldosterone system
and hypertension : where are we ? *J. Hypertens.* 21 : 2219-2222, 2003.

BOUTOUYRIE P., GIMENEZ-ROQUEPLO A.-P., FINE E., LALOUX B., FIQUET-
KEMPF B., PLOUIN P.-F., JEUNEMAITRE X. and LAURENT S. Evidence for carotid
and radial artery wall subclinical lesions in renal fibromuscular dysplasia. *J.*
Hypertens. 2287-2295, 2003.

BOZEC E., FASSOT C., TROPEANO A.I., BOUTOUYRIE P., JEUNEMAITRE X., LACOL-
LEY P., DABIRE H. and LAURENT S. Angiotensinogen gene M235T polymorphism
and reduction in wall thickness in response to antihypertensive treatment. *Clin.*
Sci. 105 : 637-644, 2003.

Revue et articles dans des livres

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

WILTING J., CHRIST B., YUAN L. and EICHMANN A. Cellular and Molecular
Mechanisms of Embryonic Hemangiogenesis and Lymphangiogenesis. *Naturwis-*
senschaften 90 : 433-448, 2003.

2004

RIVIÈRE G., MICHAUD A., DELOFFRE L., VANDENBULCKE F., LEVOYE A., BRETON C., CORVOL P., SALZET M. and VIEAU D. Characterization of the first non-insect invertebrate functional angiotensin converting enzyme : leech TtACE resembles the N-domain of mammalian ACE. *Biochem J* 382 : 565-573, 2004.

FOURNIE-ZALUSKI M.-C., FASSOT C., VALENTIN B., DJORDJIEVIC D., REAUX-LE GOAZIGO A., CORVOL P., ROQUES B.-P. and LLORENS-CORTES C. Brain renin-angiotensin system blockade by systematically active aminopeptidase A inhibitors : a potential treatment of salt-dependent hypertension. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101 : 7775-7780, 2004.

CHARRIER S., MICHAUD A., BADAoui S., GIROUX S., EZAN E., SAINTENY F., CORVOL P. and VAINCHENKER W. Inhibition of angiotensin I-converting enzyme induces radioprotection by preserving murine hematopoietic short-term reconstituting cells. *Blood* 104 : 978-985, 2004.

JUILLERAT-JEANNERET L., CELERIER J., CHAPUIS BERNASCONI C., NGUYEN G., WOSTL W., MAERKI H.P., JANZER R.C., CORVOL P. and GASC J.-M. Renin and angiotensinogen expression and functions in growth and apoptosis of human glioblastoma. *Br. J. Cancer* 90 : 1059-1068, 2004.

LARGER E., MARRE M., CORVOL P. and GASC J.-M. Hyperglycemia-induced defects in angiogenesis in the chicken chorioallantoic membrane model. *Diabetes* 53 : 752-761, 2004.

CAMPBELL D.J., ALEXIOU T., XIAO H.D., FUCHS S., MCKINLEY M.J., CORVOL P. and BERNSTEIN K.E. Effect of reduced angiotensin-converting enzyme gene expression and angiotensin-converting enzyme inhibition on angiotensin and bradykinin peptide levels in mice. *Hypertension* 43 : 854-859, 2004.

FUCHS S., XIAO H.D., COLE J.M., ADAMS J.W., FRENZEL K., MICHAUD A., ZHAO H., KESHELAVA G., CAPECCHI M.R., CORVOL P. and BERNSTEIN K.E. Role of the N-terminal catalytic domain of angiotensin-converting enzyme investigated by targeted inactivation in mice. *J. Biol. Chem.* 279 : 15946-15953, 2004.

PINET F., POIRIER E., FUCHS S., THARAUX P.L., CARON M., CORVOL P., MICHEL J.-B. and JOUBERT-CARON R. Troponin T as a marker of differentiation revealed by proteomic analysis in renal arterioles. *FASEB J.* 48 : 585-586, 2004.

SUZUKI Y., KOMI Y., ASHINO H., YAMASHITA J., INOUE J., YOSHIKI A., EICHMANN A., AMANUMA H. and KOJIMA S. Retinoic acid controls blood vessel formation by modulating endothelial and mural cell interaction via suppression of Tie2 signaling in vascular progenitor cells. *Blood* 104 : 166-169, 2004.

TOURNAIRE R., SIMON M.P., LE NOBLE F., EICHMANN A., ENGLAND P. and POUYSSEGUR J. A short synthetic peptide inhibits signal transduction, migration and angiogenesis mediated by Tie2 receptor. *EMBO Rep.* 5 : 262-267, 2004.

LE NOBLE F., MOYON D., PARDANAUD L., YUAN L., DJONOV V., MATTHIJSSEN R., BREANT C., FLEURY V. and EICHMANN A. Flow regulates arterial-venous differentiation in the chick embryo yolk sac. *Development* 131 : 361-375, 2004.

CAMINA J.P., CARREIRA M.C., EL MESSARI S., LLORENS-CORTES C., SMITH R.G. and CASANUEVA F.F. Desensitization and endocytosis mechanisms of ghrelin-activated growth hormone secretagogue receptor 1a. *Endocrinology* 145 : 930-940, 2004.

TOY-MIOU-LEONG M., LLORENS-CORTES C., BEAUDET A., ROSTENE W. and FORGEZ P. Receptor trafficking via the perinuclear recycling compartment accompanied by cell division is necessary for permanent neurotensin cell sensitization and leads to chronic mitogen-activated protein kinase activation. *J. Biol. Chem.* 279 : 12636-12646, 2004.

DECROUY X., GASC J.-M., POINTIS G. and SEGRETAIN D. Functional characterization of Cx43 based Gap-junctions during spermatogenesis. *J. Cell Physiol.* 200 : 146-154, 2004.

REAUX-LE GOAZIGO A., MORINVILLE A., BURLET A., LLORENS-CORTES C. and BEAUDET A. Dehydration-Induced Cross-Regulation Of Apelin And Vasopressin Immunoreactivity Levels In Magnocellular Hypothalamic Neurons. *Endocrinology* 2004 May 27.

MICHINEAU S., MULLER L., PIZARD A., ALHENC-GELAS F. and RAJERISON R.M. N-linked glycosylation of the human bradykinin B₂ receptor is required for optimal cell-surface expression and coupling. *Biol. Chem.* 395 : 39-47, 2004.

ROUSSEL R., TREGOUET D.A., HADJADI S., JEUNEMAITRE X. and MARRE M. Investigation of the human ANP gene in type I diabetic nephropathy : case-control and follow-up studies. *Diabetes* 53 : 1394-1398, 2004.

SEELY E.W., BROSHINAN K.B., JEUNEMAITRE X., OKAMURA K., WILLIAMS G.H., HOLLENBERG N.K. and HERRINGTON D.M. Effects of conjugated oestrogen and droloxifene on the renin-angiotensin system, blood pressure and renal blood flow in postmenopausal women. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* 60 : 315-321, 2004.

WINICKI M., ACCURSO V., HOFFMANN M., PAWLOWSKI R., DORIGATTI F., SANTONASTASO M., LONGO D., KRUPA-WOJCIECHOWSKA B., JEUNEMAITRE X., PESSINA A.C., SOMERS V.K., PALATINI P. and HARVEST Study Group. Physical activity and angiotensin-converting enzyme gene polymorphism in mild hypertensives. *Am. J. Med. Genet.* 125A : 38-44, 2004.

KHAN VAN KIEN P., WOLD J.E., MATHIEU F., ZHU L., SALVE N., LALANDE A., BONNET C., LESCA G., PLAUCHU H., DELLINGER A., NIVELON-CHEVALLIER A., BRUNOTTE F. and JEUNEMAITRE X. Familial thoracic aortic aneurysm/dissection with patent ductus arteriosus : genetic arguments for a particular pathophysiological entity. *Eur. J. Hum. Genet.* 12 : 173-180, 2004.

EXPOSÉS, CONGRÈS, ENSEIGNEMENTS

La Chaire de Médecine Expérimentale a accueilli pour l'année 2003-2004 le Pr Alessandro Capponi (Fac. De Médecine, Univ. Genève, Suisse) sur une Chaire Blaise Pascal, de la Fondation de l'École Normale Supérieure.

Monsieur le Pr Pierre Corvol a participé aux congrès et séminaires suivants :

2003 : Conférence à la Cité des Sciences (Janvier 2003) ; Conférence à l'Université de Maastricht (Février 2003) ; Conférence (Réseau Européen EURNET-GEN) (Avril 2003) ; Conférence plénière — Société de Pharmacologie (Lille, Avril 2003) ; Conférence Welcome-Trust (Londres, Juin 2003) ; Conférence plénière Euroconférence Institut Pasteur (Paris, Juin 2003) ; Conférence Symposium Kos (Kos, Septembre 2003) ; Conférence ECCR (Francfort, Octobre 2003) ; Conférence plénière — International Society of Proteolysis (Nagoya, Japon Novembre 2003) ; Conférence Institut Pasteur de Lille (Décembre 2003).

2004 : Conférence plénière IFR71 (Janvier 2004) ; Conférence Société d'Hypertension Artérielle (Port, Janvier 2004) ; Conférence International Society of Hypertension (ISH, Sao Paulo, Février 2004) ; Conférence plénière Japanese Society of Pharmacology (Osaka, Japon, Mars 2004) ; Conférence Société Belge de Cardiologie (Liège, Mars 2004) ; Conférence de l'Académie de Médecine (Paris, Avril 2004) ; Conférence Institut Paul Hamel (Monaco, Juin 2004).

Monsieur le Pr Xavier Jeunemaitre a participé aux enseignements suivants : Responsable de l'enseignement de Génétique à l'Université Paris VI (PCEM1, DCEM1) ; Responsable au sein de l'UFR Broussais-Hotel Dieu du Certificat de Maîtrise SBM de Paris VI « Génétique Humaine et Comparée », Membre du Comité du DEA et participation au DEA de Génétique Humaine de Paris 6-Paris 7 ; Participations au Certificat C2 de Biologie Moléculaire (Paris V, Pr Delpech), à la Maîtrise des Sciences Biologiques et Médicales Physiologie et Biologie des Systèmes Intégrés (Paris 6, Pr Paillard), au DEA de Pharmacologie Cardiovasculaire organisé par les Pr Safar et Sassard, au Diplôme Universitaire de Néphrologie Pédiatrique (UFR Necker-Enfants Malades, Pr Broyer), au DES d'Endocrinologie de Paris 6 (Pr Paillard), au DEA de Génétique Humaine de la Maîtrise d'Orsay (Pr Feuteun).

Monsieur le Pr Xavier Jeunemaitre a participé aux congrès et séminaires suivants :

Président-Elect de l'ECCR (European Conference on Cardiovascular Research) 2002-4 : organisation de cette réunion annuelle européenne, ayant lieu sur 3 jours en Octobre ; Octobre 2003 : Frankfurt (Germany) ; Octobre 2004 : Nice (France).

Membre du Bureau de la Société Française d'HTA 2002-6. À ce titre, participation à l'organisation des Journées l'Hypertension Artérielle, ayant lieu en décembre de chaque année ; « Gènes de susceptibilité et hypertension artérielle », aux XIII^e Journées de la Société Française de Cardiologie, Paris, janv. 17, 2003 ;

« Genetics of glucocorticoid hypertension », aux 6^e Rencontres Franco-Américaines de Bobigny, Fev, 2, 2003 ; « Gènes et hypertension artérielle », Colloque de la Société Française de Génétique Humaine, Clermont-Ferrand, April, 4, 2003 ; « Génétique et Hypertension Artérielle : quelles stratégies pour quelles découvertes ? », GRRC, Grenoble, April, 16, 2003 ; « Genetics of essential hypertension : multiples strategies for a complex trait », R. Tigerstedt Lecture at the Annual Scientific Symposium of the Finnish Hypertension Society, Helsinki, April 23-25, 2003 ; « Pseudohypoaldosteronism type II » Meeting on Aldosterone and Enac, from Genetics to Physiology, Banff, Canada, Sept 13-17 2003.

M^{me} Catherine Monnot a participé aux congrès et séminaires suivants : Congrès annuel de la Société française d'athérosclérose, Biarritz, 19-21 juin 2003 ; 21^e congrès du Groupe de Réflexion sur la Recherche Cardiovasculaire. La Baule, 22-23 avril 2004 ; 8^e colloque national d'angiogenèse, Annecy, 6-7 mai 2004 ; Regulation and therapeutic potential of the PI3-kinase/PKB signalling pathway — Cell signalling symposium — Dundee (UK) — 6-9 juin 2004.

M^{me} Catherine Monnot a participé aux enseignements suivants : 27 avril 2004. Formation permanente du centre scientifique d'Orsay (Université Paris-Sud XI) : Pharmacologie et toxicologie moléculaires (module 1). Bases moléculaires de la pharmacologie.

Monsieur Laurent Muller a participé aux congrès suivants : Eighth International conference on Endothelin, novembre 2003, Tsukuba, Japon.

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

Monsieur Jean-Marie Gasc et son groupe ont participé aux conférences et séminaires suivants :

Étienne Larger a animé un séminaire sur « Diabète et Angiogenèse » au cours de Diabétologie Intensive de l'Alfediam (Paris, 2003).

Katia Savary a présenté une communication orale à la 7^e réunion du Réseau Français d'Angiogenèse (Bordeaux) ; une communication orale à la 8^e réunion de l'European Council for Cardiovascular Research (ECCR) Prix de finaliste au concours « Young investigator awards » : Présentation orale à la Gordon Research Conference (GRC) on Angiotensin, Ventura, California.

Stages : Katia Savary a fait un stage d'un mois à Emory University (Atlanta, Georgia) dans le laboratoire du Pr K. Bernstein.

Monsieur Stéphane Germain et son groupe a participé aux congrès et séminaires suivants :

2003 : Société Française d'Hypertension Artérielle, Paris, France. Hypoxie et expression différentielle de gènes par les cellules endothéliales : Vers la caracté-

térisation des précurseurs endothéliaux circulants (PECs) ; Colloque National du réseau français d'Angiogenèse, Bordeaux, France. Angiopoietin-like 4 (ANGPTL4) : A hypoxia-induced proangiogenic factor produced during ischemia and in conventional renal cell carcinoma ; Groupement de réflexion et de recherche cardiovasculaire, Grenoble, France. L'Angiopoietin-like 4 (ANGPTL4) : un lien entre angiogenèse induite par l'hypoxie et troubles métaboliques.

2004 : Keystone Conference on Angiogenesis, Santa Fe, New Mexico, USA. Hypoxia-induced gene expression in endothelial cells : identification of Angiopoietinlike 4 ; European School of Haematology, Helsinki, Finlande. Hypoxia-induced gene expression in endothelial cells : identification of Angiopoietin-like 4 ; European School of Hypertension, Paris, France. Transcriptomic Analysis : the current tools... : Towards molecular medicine ; Colloque National du réseau français d'Angiogenèse, Annecy, France : 1) Angiopoietin-like 4 (ANGPTL4) : A hypoxia-induced proangiogenic factor produced during ischemia and in conventional renal cell carcinoma. ; 2) Thrombospondin-1 & critical leg ischemia ; 3) Le facteur angiogénique ANGPTL-4 : rôle et mécanismes de régulation des interactions avec la matrice extracellulaire ; Groupement de réflexion et de recherche cardiovasculaire, La Baule, France : 1) Modulation de l'angiogenèse par transfert de gènes. ; 2) Vascular Gene Expression In Patients With Critical Leg Ischemia : Overexpression Of Thrombospondin 1 ; 3) Le facteur angiogénique ANGPTL-4 : rôle et mécanismes de régulation des interactions avec la matrice extracellulaire.

Monsieur Stéphane Germain a participé aux enseignements suivants : DEA de pharmacologie expérimentale et clinique (option pharmacologie cardiovasculaire) — Prof. Alain Berdeaux (Paris XI) ; DEA de biologie du vieillissement — Prof. Yves Courtois (Paris V) ; Tutorat de Physiologie, École Supérieure de Physique-Chimie Industrielle, Paris. Pr Bernard Calvino.

Madame Catherine Llorens-Cortes et son équipe ont participé aux congrès et séminaires suivants : 3rd international meeting, October 23-24, 2003, Paris, France ; ASN 36th Annual Meeting & Scientific, November 14-14, 2003, San Diego, CA, USA ; 6^e Colloque de la Société des Neurosciences. Rouen, France, 13-16 Mai 2003 ; 31^e Colloque de la Société de Neuroendocrinologie et 7^e Journée LARC/Neuroscience, Paris, Centre Hospitalier Saint-Anne, 15-18 Septembre 2003 ; Journée de l'institut de Biologie du Collège de France, 23 Septembre 2003 ; GRC conference, Angiotensin Satellite Symposia, February 28-29, 2004, Ventura, CA, USA.

Madame Catherine Llorens-Cortes a donné les séminaires suivants :

2003 : Angiotensin III : a central regulator of vasopressin release and blood pressure — 46th Annual Meeting of the Western Pharmacology Society — Lake Tahoe, Nevada (USA) — 2-6 Février 2003 ; Utilisation de l'internalisation pour rechercher le ligand endogène d'un GPCR orphelin : application au récepteur de l'apéline — Atelier d'Imagerie Cellulaire en Neurosciences — Rouen (France) — 13 Mai 2003 ; Orphan GPCRs : from ligand discovery to physiological role.

Application to apelin — Second Joint French-Swiss Meeting on Medicinal Chemistry — Beaune (France) — 1-4 Juillet 2003 ; Llorens-Cortes C. L'apéline : un nouveau neuropeptide impliqué dans la régulation de l'homéostasie hydrosodée et des fonctions cardiovasculaires. Journée de l'institut de Biologie du Collège de France, 23 Septembre 2003 ; Llorens-Cortès C., De Mota N., Réaux-Le Goazigo A., El Messari S., Chartrel N., Moos F., Vaudry H. Apelin, a novel neuropeptide involved in the control of body fluid homeostasis and cardiovascular functions. Symposium on new research trends in higher brain functions and their pharmacology : from molecular to cognitive level. Ajaccio (France) — Octobre, 2003 ; Parenterally active aminopeptidase A inhibitors reduce blood pressure by blocking the brain renin-angiotensin system activity : a new strategy for the treatment of hypertension — International Protease Symposium General Meeting, Nagoya, Japon — 10-13 Nov 2003.

2004 : Atelier « Du peptide naturel... au médicament ». L'apéline, un nouveau neuropeptide : de la découverte du ligand au rôle physiologique — La Grande Motte (France) 26-28 Février 2004 ; Central actions of Ang III in Hypertension — GRC conference, Angiotensin Satellite Symposia, February 28-29, 2004, Ventura, CA, USA.

Madame Annabelle Reaux-Le Goazigo a donné les séminaires suivants : Rôle physiologique d'un nouveau neuropeptide, l'apéline — 31^e Colloque de la Société de Neuroendocrinologie et 7^e Journée LARC/Neuroscience — Paris, CH Saint-Anne, 15-18 Septembre 2003.

Madame Catherine Llorens-Cortes a participé aux enseignements suivants : Niveau : Cours de perfectionnement (chercheurs Sanofi) — Lieu : Strasbourg et Toulouse — Université : Sanofi — Synthelabo — Intitulé : Réceptologie ; Niveau : 3^e cycle C2 de Maîtrise et Diplôme d'Université « Pharmacologie Endocrinienne » Lieu : UFR Lariboisière-St-Louis, 10 Avenue de Verdun 75010 Paris, Université : Paris VII — Intitulé : Conception et structure des molécules d'intérêt thérapeutique.

Madame Anne Eichmann et son équipe ont participé aux congrès et séminaires suivants :

Anne Eichmann : Conférencier invité : EMBO workshop : a decade of semaphorin research : semaphorin structure and function. Juin 3-6, Cargèse, Corse. *Neuropilin receptors in vascular development* ; Gordon Conference on Angiogenesis and Microcirculation, August 10-15, Rhode Island, USA. *Neural receptors in vascular development* ; TuBs symposium on stem cells, Turku, Finlande, August 16th, 2003. *Vascular development : from hemangioblasts to arteries and veins* ; Séminaire : *Développement du réseau artéro-veineux*. Cours au Collège de France, Juin 12, 2003, Chaire du Prof. Spyros Artavanis-Tsakonas ; Keystone symposium on Angiogenesis and Microcirculation, January 7-14, Santa Fe, New Mexico, USA. *Neural receptors in vascular development* ; Franqui symposium « Angiogenesis and neurogenesis », Brussels, March 6-7. *Neural receptors in*

angiogenesis ; ESH conference on Angiogenesis, Helsinki, Finland, May 21-24. *Neural receptors in angiogenic guidance.*

Luc Pardanaud : Congrès : 1st joint meeting of the british and french societies for developmental biology, Nice 13-16 septembre 2003.

Séminaire : 25 novembre 2003 : Laboratoire d'Histologie, d'Embryologie et de Cytogénétique, Faculté de Médecine Pitié-Salpêtrière, Université Paris VI : *Étude du système vasculaire dans le modèle des chimères caille-poule.* Invitation du Dr Martin Catala.

Benjamin Pavin DeLafarge : Conférencier invité : Réseau Français d'Angiogenèse, Annecy, Mai 6-7 2004 : *Récepteurs de guidage axonal dans le développement vasculaire.*

Ferdinand le Noble : Conférencier invité : Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG), meeting of promising junior scientists in angiogenesis, August 30th, 3003, Freiburg, Germany. *Regulation of arterio-venous differentiation and branching pattern* ; Weinstein conference on developmental biology, Leiden, Pays-Bas, May 15th : *Flow regulation of arterio-venous differentiation.*

LISTE DES DIPLÔMÉS

DEA

Armelle Bardier : DEA de Différenciation Cellulaire et Fonctions Intégrées, Université de Paris VI.

Soutenu le 30 Juin 2003. *Expression génique dans les cancers conventionnels du rein et des cardiopathies ischémiques.*

Cédric Claperon : DEA de l'Université Paris V-René Descartes.

Soutenu le 28 Juin 2004. *Caractérisation du site de liaison du calcium de l'aminopeptidase A par modélisation moléculaire et mutagenèse dirigée.*

Emmanuelle Le Coz : DEA de Physiopathologie Cellulaire et Moléculaire, Université Pierre et Marie Curie, Paris VI.

Soutenu le 30 Juin 2004. *Rôle de l'angiopoïétin-like 4 dans les processus tumoraux et angiogéniques.*

Laetitia Loviconi : DEA de différenciation cellulaire et fonctions intégrées, Paris VI, École doctorale de physiologie et physiopathologie.

Soutenu en Juin 2004. *Interactions Akt/PEA-15/ERKs : analyse et rôle dans la prolifération et la sécrétion d'aldostérone induites par l'angiotensine II.*

THÈSES

Delphine Moyon : Thèse de Doctorat d'Université, Spécialité : Biologie du développement, Paris VII.

Soutenu le 9 Septembre 2003. Mention très honorable avec les félicitations du jury. *Étude de la différenciation artéro-veineuse et lymphatique chez l'embryon.*

Céline Dugourd : Thèse de Doctorat Université Paris XI (Spécialité : biologie moléculaire de la cellule).

Soutenue le 10 décembre 2003. *Rôle des interactions des voies PI3-K et ERK dans la régulation de la réponse proliférative de l'angiotensine II via le récepteur ATI.*

Raphaël Rozenfeld : Thèse de Doctorat de l'Université Paris V-René Descartes, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques.

Soutenue le 11 Juin 2004. *Étude du site actif de l'aminopeptidase A par modélisation moléculaire et mutagenèse dirigée. Définition du rôle du domaine C-terminal de cette enzyme.*