L'annuaire du Collège de France
Cours et travaux

109 | 2010
Annuaire du Collège de France 2008-2009

Médecine expérimentale

Pierre Corvol

Édition électronique
URL : https://journals.openedition.org/annuaire-cdf/359
DOI : 10.4000/annuaire-cdf.359
ISBN : 978-2-7226-0138-3
ISSN : 2109-9227

Éditeur
Collège de France

Édition imprimée
Date de publication : 1 mars 2010
Pagination : 405-426
ISBN : 978-2-7226-0083-6
ISSN : 0069-5580

Référence électronique
Pierre Corvol, « Médecine expérimentale », *L'annuaire du Collège de France* [En ligne], 109 | 2010, mis en ligne le 24 juin 2010, consulté le 22 août 2022. URL : http://journals.openedition.org/annuaire-cdf/359 ; DOI : https://doi.org/10.4000/annuaire-cdf.359

Ce document a été généré automatiquement le 22 août 2022.

Tous droits réservés

Médecine expérimentale

Pierre Corvol

Apéline, adrénomédulline et urotensine

1 Le cours de la chaire de Médecine expérimentale en 2009 est la suite du cours de 2008 sur trois peptides vasoactifs récemment découverts : l'apéline, l'adrénomédulline et l'urotensine II. Ces peptides partagent des propriétés communes sur le système cardiovasculaire et offrent un intérêt thérapeutique potentiel en pathologie cardiovasculaire.

2 L'apéline, découverte en 1998, se lie à un récepteur couplé aux protéines G, lui-même découvert cinq années auparavant. L'apéline et son récepteur, dénommé APJ, sont présents dans de nombreux tissus : système nerveux central, hypophyse, poumons, cœur et vaisseaux, pancréas, estomac, reins, etc. Sur le plan cardiovasculaire, l'apéline exerce un effet inotrope positif et augmente la vitesse de conduction cardiaque. Elle a un effet vasodilatateur lorsque l'endothélium vasculaire est intact et exerce une activité pro-angiogénique. L'apéline joue un rôle important dans le développement du système cardiovasculaire au cours de l'embryogénèse, mais son rôle varie suivant les espèces : chez le poisson zèbre, l'apéline est exprimée très précocement et intervient dans le développement du tube cardiaque primitif ; chez le xénope, elle est exprimée dans le système artériel et veineux. L'inactivation du système apélinergique entraîne des anomalies de formation des vaisseaux intersomitiques ; chez la souris, l'apéline est aussi exprimée précocement dans tout le lit vasculaire sans qu'il ait été rapporté jusqu'à présent d'anomalie flagrante du développement des vaisseaux en cas d'inactivation de l'apéline ou de son récepteur.

3 Le cours a fait le point sur des données récentes concernant les effets cardiovasculaires et métaboliques de l'apéline. Les premières études des effets vasculaires de l'apéline chez l'homme ont été publiées par Japp *et al.* (JACC, 2008) : la perfusion d'apéline n'a pas d'effet veinodilatateur ; en revanche, la perfusion intra-artérielle d'apéline entraîne une vasodilatation du territoire artériel, tel qu'on peut l'observer par

pléthysmographie veineuse. Cet effet est essentiellement lié à la production de NO puisqu'il est aboli par la perfusion d'un inhibiteur de la NO-synthase.

4 L'effet pro-angiogénique de l'apéline a été étudié en détail par plusieurs équipes dans différents modèles. Dans un premier travail, Eyries *et al.* (Circ. Res., 2008) ont montré que l'hypoxie stimule la synthèse d'ARN messager codant pour l'apéline. Après avoir identifié des éléments de réponse à l'hypoxie sur le gène de l'apéline, ces auteurs ont montré que le facteur inductible par l'hypoxie, *Hypoxia-Inducible Factor* (HIF), interagissait avec un de ces éléments situé dans le premier intron du gène. L'apéline induit la prolifération de cellules endothéliales en hypoxie sans intervention du VEGF. Elle régule aussi *in vivo* la prolifération des cellules vasculaires dans le modèle de régénération de la nageoire du poisson zèbre. Enfin, l'apéline joue un rôle important dans le développement de la vascularisation rétinienne en période post-natale. La maturation de la vascularisation rétinienne requiert une dizaine de jours après la naissance chez la souris. En utilisant des souris dont le gène de l'apéline a été inactivé, Kazai *et al.* (Arterioscl. Thromb. Vasc. Biol., 2008) ont montré que l'apéline jouait un rôle essentiel dans l'angiogenèse rétinienne pendant une période critique de quelques jours. On note un retard de vascularisation de la rétine chez les souris dont le gène de l'apéline a été inactivé (apéline -/-). L'apéline exercerait un effet pro-angiogénique en coopération avec le VEGF et le FGF. Le rôle de l'apéline est vraisemblablement cantonné à la vascularisation rétinienne post-natale chez la souris car il n'y a ni modification de la vision, ni anomalie rétinienne à l'âge adulte chez la souris apéline -/-. Toutefois, il a été noté une malformation oculaire due à la persistance des vaisseaux primaires hyaloïdes du vitrée chez les souris apéline -/-. Ces anomalies sont proches d'anomalies du vitrée chez l'homme liées à la persistance des vestiges vasculaires du vitrée. Il pourrait être intéressant de rechercher des anomalies génétiques chez des patients atteints de cette pathologie.

5 L'apéline intervient aussi dans la vascularisation du tissu adipeux : dans un modèle d'angiogenèse induite *in vivo* par la transplantation de tissu adipeux épididymaire chez la souris, l'inactivation de l'apéline par siRNA provoque une raréfaction de la vascularisation du tissu adipeux, un résultat à rapprocher d'études antérieures montrant que la croissance du tissu adipeux dépend, entre autres, de l'angiogenèse. Outre son effet sur l'angiogenèse du tissu adipeux, l'apéline intervient dans le métabolisme intermédiaire. Elle est synthétisée et secrétée par les adipocytes, et son taux est élevé dans le tissu adipeux et le plasma lors des états d'obésité avec hyper-insulinémie. Chez l'homme, l'apéline plasmatique s'élève parallèlement au degré d'obésité. Elle s'abaisse durant le jeune et est augmentée, ainsi que l'insulinémie, lors de la reprise alimentaire. Dans une étude récente, Dray *et al.* (Cell Metabolism, 2008) ont montré que l'apéline abaisse la glycémie par une utilisation accrue du glucose dans les tissus. L'apéline augmente la capture du glucose dans le muscle squelettique par l'intermédiaire de la NO synthase, de l'AMP kinase et d'Akt. Chez la souris obèse et insulino-résistante, l'apéline accroît le transport du glucose. En définitive, selon cette étude, l'apéline pourrait avoir un intérêt en pathologie en améliorant la sensibilité à l'insuline et en abaissant la glycémie.

6 Des résultats discordants ont été rapportés sur le rôle de l'apéline dans l'athérome expérimental. Dans une première étude, Ashimoto *et al.* (Am. J. Pathol., 2007) avaient montré que les souris dont le gène codant pour le récepteur APJ avait été inactivé étaient moins susceptibles à l'athérosclérose. Le modèle utilisé était celui de l'athérome

aortique induit par le croisement des souris hypercholestérolémiques ApoE -/- avec les souris APJ -/-. Leurs résultats suggéraient que l'apéline avait un rôle délétère en augmentant le stress oxydatif. Des résultats différents ont été rapportés par Shun *et al.* (J. Clin. Invest., 2008) en perfusant de l'apéline ainsi que de l'angiotensine II chez des souris apéline -/- croisées avec des souris ApoE -/-. Dans ces conditions, l'apéline s'oppose aux effets athérogéniques de l'angiotensine II et à la formation d'anévrysmes : on observe une diminution des anévrysmes aortiques et de l'athérome. Cet effet est indépendant des variations tensionnelles induites par l'apéline. Shun *et al.* proposent un mécanisme original expliquant l'effet protecteur de l'apéline vis-à-vis de l'angiotensine II. Ils montrent une interaction *in vitro* et
in vivo entre le récepteur AT1R de l'angiotensine II et APJ. La formation d'hétérodimère pourrait perturber la signalisation de l'angiotensine II. Restent à expliquer les résultats discordants des deux études précitées : différence de fond génétique des souris, perfusion d'apéline et doses élevées d'angiotensine II dans l'étude de Chun *et al.*, ou encore différence des teneurs en cholestérol des régimes ?

7 À l'issue de l'ensemble des travaux récents sur l'apéline, essentiellement réalisés chez l'animal, il est tentant de faire de ce peptide un antagoniste physiologique de l'angiotensine II. L'angiotensine II élève la pression artérielle, exerce un effet pro-inflammatoire en générant des dérivés radicalaires de l'oxygène et un effet pro-athéromateux, elle élève la sécrétion de vasopressine. L'apéline s'oppose point par point à ces différents effets. L'angiotensine II abaisse l'expression de l'apéline et le récepteur APJ pourrait contrecarrer les effets du récepteur de l'angiotensine II. De fait, les premiers résultats expérimentaux et cliniques suggèrent que l'apéline et l'angiotensine II s'opposent au cours de l'insuffisance cardiaque. Il pourrait donc être intéressant d'élever les taux circulants d'apéline plasmatique soit à l'aide d'un agoniste non-peptidique mimant ses effets, soit encore en bloquant la dégradation de l'apéline endogène par un inhibiteur des peptidases impliquées dans son métabolisme.

Adrénomédulline

8 L'adrénomédulline est un peptide vasodilatateur découvert en 1993 par Kitamura *et al.* (Biochem. Biophys. Res. Commun., 1993) à partir de phéochromocytomes humains. Le criblage initial à l'origine de cette découverte s'est fait sur l'élévation du taux d'AMP cyclique plaquettaire par stimulation de la PKA en présence d'extraits tissulaires ou de peptides variés. En utilisant cette technique, le groupe de Kitamura avait déjà montré la présence de VIP et de CGRP dans le même tissu. L'apéline fait partie de la super famille de la calcitonine et du *calcitonin gene related peptide* (CGRP). Outre l'adrénomédulline, peptide de 52 acides aminés, cette famille comporte les deux isoformes du CGRP (CGRP 1 et 2), l'amyline et un peptide proche de l'adrénomédulline, l'intermédine. Tous ces peptides ont en commun un pont disulfure de six acides aminés, indispensable à l'activité biologique, et sont amidés en C-terminal. L'adrénomédulline est issue d'un précurseur de 185 acides aminés comportant un peptide signal de 21 acides aminés, un peptide N-terminal, maturé par les proconvertases et appelé N-terminal pro-adrénomédulline peptide (PAMP). Comme l'adrénomédulline, le PAMP est amidé en C-terminal. Ses effets sont proches de ceux de l'adrénomédulline, notamment les effets pro-angiogéniques. L'adrénomédulline elle-même est maturée par l'action successive de proconvertases et d'une enzyme d'amidation, la peptidyl alpha-amino mono-

oxygénase. Dans les tissus et le plasma, les deux formes d'adrénomédulline amidée et non amidée co-existent, mais seule la forme amidée est active. Le fragment 15-52 de l'adrénomédulline, qui comporte toujours le pont disulfure, est biologiquement actif. En revanche, le fragment 22-52, dépourvu du pont disulfure, est un antagoniste du récepteur de l'adrénomédulline. L'adrénomédulline est exprimée de façon ubiquitaire au cours du développement et à l'état adulte. Elle est présente dans le système cardiovasculaire, le poumon, le rein, la surrénale, le tube digestif, le système nerveux central, etc.

9 Le cours s'est attaché au rôle de l'apéline dans le système cardiovasculaire. L'apéline est présente dans les oreillettes et les ventricules cardiaques, les cardiomyocytes, les gros vaisseaux tels que l'aorte ainsi que dans les microvaisseaux (endomètre et placenta). Elle est synthétisée et produite par les cellules endothéliales musculaires lisses vasculaires. Elle est régulée par différentes hormones (angiotensine II, hormones thyroïdiennes, corticoïdes), des cytokines telles que le TNFα et des facteurs physico-chimiques tels que l'hypoxie, les forces d'étirement ou de cisaillement.

10 L'adrénomédulline circule dans le plasma sous une forme libre et sous une forme liée à une protéine sérique, le facteur H du complément. Cette liaison protéique la protège de la dégradation protéolytique et potentialiserait sa liaison au récepteur et donc son activité biologique. Ces différents éléments, ajoutés à l'existence d'une forme amidée et non amidée, expliquent les difficultés du dosage de l'adrénomédulline libre, active. Le taux plasmatique serait de l'ordre de 2 à 20 pmol/l. Elle est éliminée par le rein et est aussi métabolisée au niveau pulmonaire.

11 La découverte du récepteur de l'adrénomédulline a suivi de cinq ans la découverte de son ligand. En 1998, McLatchie *et al.* publiaient dans *Nature* un nouveau mécanisme de liaison des hormones de la famille de la calcitonine. La calcitonine se lie à un récepteur couplé aux protéines G. Le *calcitonin gene related peptide* (CGRP), peptide apparenté à la calcitonine, se lie à un récepteur proche de ce dernier et appelé pour cette raison *calcitonin like receptor* (CLR). McLatchie *et al.* ont montré que le CLR s'associait à des protéines appelées *receptor activity modified proteins* (RAMP) qui conditionnent l'affinité du CLR pour ses ligands. L'association de CLR avec RAMP 1 aboutit à la formation d'un récepteur spécifique pour le CGRP ; le récepteur AM1 de l'adrénomédulline est constitué du CLR et d'une autre RAMP, RAMP 2. Il est spécifique pour l'adrénomédulline. Un deuxième récepteur de l'adrénomédulline, AM2, est constitué de CLR et de RAMP 3. Il lie à la fois l'adrénomédulline et le CGRP. Les RAMP s'associent au récepteur CLR dans le réticulum endoplasmique, l'accompagnent dans le Golgi en jouant un rôle de molécule chaperonne et s'insèrent par un seul domaine transmembranaire dans la membrane plasmique. Cette découverte a contribué au concept d'hétérodimérisation des récepteurs couplés aux protéines G. Outre leur rôle dans le trafic intracellulaire du récepteur et la liaison de son ligand, les RAMPs interviennent dans la désensibilisation et la signalisation intracellulaire du récepteur.

12 Le récepteur de l'adrénomédulline est couplé à l'adénylate cyclase et stimule donc PKA. Il est couplé à PI3 kinase/Akt et favorise la synthèse de monoxyde d'azote. Le récepteur de l'adrénomédulline peut aussi transactiver un récepteur de croissance à tyrosine-kinase et par là accroître l'activité d'ERK, favoriser une action mitogénique et ainsi s'opposer à l'action antiprolifératives induite par PKA et NO.

13 L'adrénomédulline exerce un effet cardiaque chronotrope et inotrope positif, augmente le flux coronarien et inhibe l'hypertrophie des cardiomyocytes ainsi que la production

de matrice extracellulaire dans le coeur. La perfusion d'adrénomédulline abaisse la pression artérielle et élève la pression cardiaque et le débit cardiaque chez l'animal. Chez le sujet sain, elle entraîne une baisse de la pression artérielle, une élévation modeste de la fréquence et du débit cardiaque. Elle inhibe le taux d'aldostérone plasmatique alors même qu'elle stimule la sécrétion de rénine. Au cours de l'insuffisance cardiaque congestive et dans l'infarctus du myocarde, l'adrénomédulline a des effets hémodynamiques et hormonaux similaires à ceux observés chez le sujet sain, quoique moins marqués : baisse modeste de la pression cardiaque, élévation de la fréquence et de l'index cardiaque, baisse de la pression artérielle pulmonaire (Nagaya *et al.*, Circulation, 2000 ; J. Cardiovasc. Pharmacol., 2002). En perfusion aiguë, l'adrénomédulline a un effet cardioprotecteur et bénéfique en pathologie cardiaque tant expérimentale qu'humaine. L'absence de produits non peptidiques mimant l'effet biologique de l'adrénomédulline amène à avoir recours à des modèles animaux pour évaluer à long terme ses effets. Ainsi, Imai *et al.* (Arterioscl. Thromb. Vasc. Biol., 2002) montrent que l'adrénomédulline surexprimée par transgenèse chez la souris exerce un effet cardio-protecteur lié à la production de NO.

14 Le rôle du système adrénomédulline en physiologie et en physiopathologie a été étudié par l'inactivation génique du ligand ou de son récepteur. L'inactivation du système adrénomédulline/récepteur CLR/RAMP2 provoque des anomalies vasculaires au cours du développement embryonnaire. Les équipes de Shindo *et al.* (Circulation, 2001) et de Caron et Smithies (PNAS, 2001) ont généré des souris dont le gène de l'adrénomédulline a été inactivé (AM-/-). On observe une létalité des embryons AM -/- à mi-gestation. L'équipe de Shindo a rapporté des anomalies vasculaires, des hémorragies sous-cutanées et viscérales, une ischémie placentaire. L'examen des vaisseaux par microscopie électronique a révélé que les cellules endothéliales se détachaient de la membrane basale. L'adrénomédulline interviendrait dans la production de la membrane basale, elle-même impliquée dans la prolifération, la migration et la différenciation des cellules de la paroi vasculaire. Le groupe de Caron et Smithies rapporte des résultats quelque peu différents chez les embryons à mi-gestation : anasarque fœtal, cœur diminué de volume et présence accrue de trabécules cardiaques. Les deux mêmes équipes ont réalisé l'inactivation du gène RAMP2, codant pour le co-récepteur CLR. L'inactivation de RAMP2 décrite par Ichikawa-Shindo (JCI, 2007) révèle un phénotype proche de celui de l'inactivation de l'adrénomédulline : létalité à mi-gestation, hémorragies et œdème. Les mêmes anomalies à type de détachement des cellules endothéliales vasculaires de la membrane basale sont observées. La souris adulte hétérozygote RAMP2 +/- présente une hyperperméabilité et une diminution de la néo-angiogenèse. À l'inverse, la surexpression de RAMP2 induit une baisse de la perméabilité capillaire *in vitro* et *in vivo*. Les auteurs concluent que RAMP2 est un facteur essentiel de l'angiogenèse et surtout de l'intégrité de la paroi vasculaire, sans substitution par RAMP3. Les résultats de l'équipe de Caron *et al.* (Fritz-Six *et al.*, JCI, 2007) sont en faveur d'un rôle de RAMP2 dans le développement des lymphatiques : les animaux RAMP2 -/- ont un lymphœdème important, une diminution de la taille des sacs lymphatiques, voire une quasi absence de sacs lymphatiques jugulaires. Ces auteurs trouvent que l'ensemble du système adrénomédulline est exprimé dans les cellules endothéliales d'origine lymphatique en culture.

15 Le système adrénomédulline/CLR/RAMP2 apparaît donc comme un nouvel acteur de l'angiogenèse et de la lymphangiogenèse. Les anomalies de la paroi vasculaire et de la perméabilité capillaire observées par Shindo *et al.* expliqueraient le passage anormal de

liquide plasmatique dans le secteur interstitiel. Les travaux de l'équipe de Caron *et al.* expliqueraient le mauvais retour du liquide interstitiel dans les lymphatiques dont la morphogenèse est perturbée en cas d'inactivation du système adrénomédulline. Le rôle de l'adrénomédulline dans la lymphangiogenèse *in vitro* et *in vivo* est encore conforté par des expériences récentes dans un modèle de lymphœdème de la queue de souris : la perfusion d'adrénomédulline améliore le lymphœdème expérimental (Gind *et al.*, Cardiovasc. Res., 2008).

16 L'adrénomédulline est un peptide pro-angiogénique à l'état adulte : son expression est accrue lors de l'hypoxie, elle régule la perméabilité de l'endothélium, exerce un effet sur la maturation vasculaire et potentialise l'effet du VEGF sur la formation de tubes capillaires. Elle possède des propriétés pro-angiogéniques dans l'ischémie aiguë de la patte chez la souris, ainsi qu'en cas de tumeur en accroissant la densité vasculaire dans les xénogreffes de tumeurs chez la souris. Outre son effet pro-angiogénique, l'adrénomédulline exerce un effet mitogénique direct sur plusieurs lignées cellulaires cancéreuses. Elle a aussi un effet anti-apoptotique sur les cellules endothéliales et les cellules tumorales. Le blocage du système adrénomédulline, notamment par des anticorps anti-adrénomédulline, diminue la croissance des cellules de glioblastome *in vitro* ainsi que la croissance de la tumeur injectée chez la souris (Ouafik *et al.*, Am. J. Pathol., 2002). Le développement d'antagonistes non peptidiques de l'adrénomédulline pourrait donc avoir un effet thérapeutique intéressant en pathologie tumorale associée à une néoangiogenèse.

Urotensine II

17 L'urotensine II est un peptide isolé initialement à partir de l'urophyse et de la moelle épinière de poisson (*Gillichthys Mirabilis*). L'urotensine II (UII) a été ensuite découverte chez l'homme en 1998. Il s'agit d'un peptide de douze acides aminés avec un pont disulfure et dont la structure a été conservée chez les vertébrés. Elle agit sur un récepteur couplé aux protéines G, homologue à l'un des récepteurs de la somatostatine.

18 L'urotensine II est produite par le cœur, les vaisseaux, le rein et le foie et circule à faible concentration dans le plasma. Elle exerce un effet inotrope positif et est vasoconstrictrice ou vasodilatatrice suivant l'organe utilisé et l'animal étudié. Elle exerce une action hypertrophique sur les cellules musculaires lisses vasculaires et sur les cardiomyocytes. Chez le primate, l'urotensine II provoque une baisse de la contractilité myocardique et du volume d'éjection et élève les résistances périphériques. Toutefois, les résultats sont variables chez l'homme : vasoconstriction cutanée et réduction du flux sanguin de l'avant-bras ou absence d'effet hémodynamique ont été rapportées. Enfin, l'urotensine II a des effets métaboliques : elle diminue la sécrétion d'insuline pancréatique induite par l'hyperglycémie.

19 Les possibles effets délétères de l'urotensine II, associés à son élévation au cours de l'insuffisance cardiaque, de l'insuffisance coronaire, du diabète non insulino-dépendant et de la néphropathie diabétique, ont stimulé la recherche d'inhibiteurs du système par l'industrie pharmaceutique. Toutefois, l'efficacité d'un blocage de l'urotensine II était loin d'être garantie car l'inactivation génique du récepteur de l'urotensine II n'entraîne aucune anomalie hémodynamique cardiovasculaire chez la souris adulte, ni d'ailleurs d'anomalie au cours du développement embryonnaire.

20 Un inhibiteur spécifique du récepteur de l'urotensine II, actif par voie orale, le palosuran, a été synthétisé et étudié chez le rat diabétique où il exerce un effet bénéfique sur le contrôle de la glycémie, la progression de la protéinurie et de la néphropathie diabétique. Toutefois, son administration chez l'homme s'est révélée décevante : absence d'effet sur le système cardiovasculaire et les paramètres biochimiques et hormonaux chez le sujet sain (Sidharta *et al.*, J. Pharmacol., 2005). Le palosuran s'est avéré aussi dénué d'effet significatif sur le flux sanguin rénal, l'albuminurie, le contrôle de la glycémie et de l'insulinémie chez le diabétique dans un essai de phase II chez l'homme (Sidharta *et al.*, Clin. Pharmacol. Ther., 2006).

21 Bien qu'il s'agisse d'un peptide potentiellement intéressant, les fonctions de l'urotensine II restent encore obscures chez l'homme. S'agit-il d'un peptide conservé au cours du phylum chez les vertébrés ? d'un vestige résiduel ? ou d'un peptide à action auto/paracrine dont l'action exacte reste encore à découvrir ?

22 **En conclusion**, l'apéline, l'adrénomédulline et l'urotensine II partagent plusieurs caractéristiques communes :

1. Ces peptides vasoactifs récemment découverts sont conservés tout au long de l'évolution chez les vertébrés. Ils sont tous issus d'un large précurseur polypeptidique et sont maturés par des proconvertases. Les peptides actifs sont de petite taille et pour deux d'entres eux, l'adrénomédulline et l'urotensine II, ont une conformation restreinte du fait d'un pont disulfure. Ils sont secrétés, circulent dans le plasma et exercent une fonction autocrine et paracrine ;
2. Les récepteurs de ces peptides sont tous des récepteurs couplés aux protéines G. Outre la signalisation dépendant des protéines G, ils sont vraisemblablement capables d'activer des récepteurs de croissance à tyrosine-kinase par transactivation ;
3. Apéline, adrénomédulline et urotensine II ont une distribution ubiquitaire : ils sont exprimés dans le système cardiovasculaire, le système nerveux central, le foie et les adipocytes. L'apéline et l'adrénomédulline sont des adipokines ;
4. Ces peptides exercent des effets pléïotropiques. Ils agissent comme modulateur ou régulateur de la fonction cardiovasculaire, parfois en s'opposant à un autre système peptidergique vasoactif, comme dans le cas de l'apéline vis-à-vis de l'angiotensine II. Ils peuvent favoriser la croissance des cellules de la paroi vasculaire et ont une action cardiaque directe ;
5. Ces peptides ont une action pro-angiogénique et, dans le cas de l'apéline et de l'adrénomédulline, ils facilitent la croissance tumorale par un effet tumorigénique direct et/ou une action pro-angiogénique sur les vaisseaux tumoraux ;
6. Leur importance en physiologie et en physiopathologie humaine reste encore à déterminer. Toutefois, il semble qu'ils soient élevés au cours de l'insuffisance cardiaque et de l'ischémie cardiaque.

23 Le développement d'agonistes et d'antagonistes non-peptidiques de ces trois peptides permettra de mieux comprendre leur rôle chez l'animal puis chez l'homme sain et pathologique. Il est encore prématuré de savoir quels types de pathologies pourraient en bénéficier.

Rapport d'activité du laboratoire

I – Contrôle moléculaire du développement vasculaire[1]

24 Équipe : A. Eichmann, L. Pardanaud, F. Lebrin, S. Sutching, B. Larrivée, R. Del-Toro Estevez, I. Brunet, A. Leroyer, C. Prahst, K. Bouvrée, Y. Xu, T. Mathivet, S. Srun, C. Bréant, L. Pibouin-Fragner.

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

25 L'angiogenèse par bourgeonnement procède de manière analogue à la morphogenèse des tubes épithéliaux de la trachée chez la Drosophile. Pendant ce processus, des cellules uniques sont sélectionnées pour former l'extrémité (le « tip ») d'un bourgeon. Ces cellules répondent au facteur FGF (*branchless*) par une extension de filopodes et prennent la tête du bourgeon croissant. Les cellules situées derrière les cellules tip suivent, mais ne deviennent pas « tip ». Ni les tip, ni les autres cellules ne sont pré-spécifiées, mais il existe une compétition entre plusieurs cellules aboutissant à ce que celles avec le taux le plus élevé du récepteur FGF prennent la tête, alors que celles avec une activité moindre prennent la suite. Cette compétition implique une inhibition latérale médiée par Notch qui empêche des cellules surnuméraires de prendre la tête du bourgeon (Ghabrial & Krasnow, 2006, *Nature* **441** : 746-9).

26 La sélection des « tip cells » dans le système vasculaire est sous le contrôle de voies de signalisation similaires. Les cellules tip à la tête des capillaires en bourgeonnement sont induites par la signalisation du VEGF agissant sur son récepteur VEGFR2 (Gerhardt *et al.*, 2003, *J Cell Biol* **161** : 1163-77). Les cellules tip expriment aussi des taux importants de Delta-like 4 (Dll4), un ligand de Notch. L'expression de Dll4 est en aval de la signalisation VEGF, puisque le blocage de cette signalisation par un VEGFR soluble diminue l'expression de DLL4 dans les *tip cells*. L'inactivation génique d'un allèle de dll4 chez la souris provoque une formation excessive de *tip cells* dans le réseau capillaire de la rétine (Suchting *et al.*, 2007, *PNAS* **104** : 3225-30). Un phénotype similaire est obtenu après inactivation pharmacologique de Notch au moyen d'inhibiteurs des γ-sécrétases ou après la délétion endothélial-spécifique inductible du récepteur Notch-1. L'inactivation de *dll4* s'accompagne d'un changement des taux d'expression des récepteurs du VEGF (22), indiquant que DLL4 régule négativement la réponse des cellules endothéliales (CE) au VEGF et agit comme un frein de cette signalisation, contrôlant ainsi la formation d'un nombre limité de tip cells. Un autre ligand de Notch, Jagged-1, a récemment été décrit comme un antagoniste de Dll4 (Benedito *et al.*, 2009, *Cell* **137** : 1124-35), favorisant ainsi la compétition des cellules pour le positionnement à la tête des capillaires (34).

2. Facteurs de guidage des axones dans le système vasculaire

27 Il existe aussi des similarités entre le bourgeonnement des capillaires et le guidage axonal. Comme les *tip cells* en tête des capillaires, les cônes de croissance à l'extrémité de l'axone émettent de nombreux filopodes qui répondent aux facteurs de guidage présents dans l'environnement, y compris les nétrines. Parmi les récepteurs des facteurs de guidage axonal, plusieurs présentent une expression limitée aux vaisseaux sanguins. Au cours de l'évolution et de la diversification de ces familles de molécules de

guidage, l'expression d'un certain nombre de récepteurs a été annexée par le système vasculaire. Parmi les récepteurs de la Nétrine-1, UNC5B est exprimé sélectivement dans les CE, y compris dans les *tip cells*. Des études de perte de fonction par inactivation des gènes codant pour ces récepteurs chez la souris montrent que leur fonction de récepteur de guidage est conservée dans leur nouvel environnement tissulaire : les souris *unc5b* déficientes développent une arborisation vasculaire aberrante aussi bien pendant la vie embryonnaire que pendant la néovascularisation induite expérimentalement chez l'adulte (12, 35). Gouverner la croissance vasculaire pourrait avoir des implications thérapeutiques importantes. En effet, le traitement avec la nétrine-1 empêche la progression de « tip » capillaires exprimant unc5b lors de la néovascularisation tumorale chez la souris et l'oiseau (35, 13). L'expression vasculaire d'unc5b est conservé au cours de l'évolution entre la souris et le poulet et son rôle de récepteur de guidage répulsif empêchant une vascularisation excessive semble aussi conservée (13).

3. Discrimination entre défauts génétiques et hémodynamiques chez des mutants neuropiline-1

28 L'inactivation de gènes importants pour le développement vasculaire provoque souvent des défauts du flux sanguin. Puisque les forces hémodynamiques sont importantes dans l'acquisition de la forme des vaisseaux, l'existence d'anomalies du flux sanguin empêche souvent la mise en évidence précise du rôle du produit du gène muté. Nous avons développé un système simple pour distinguer les défauts du flux sanguin des anomalies dues à la perte de fonction du récepteur neuropiline-1 chez la souris (14). L'analyse d'embryons de souris homozygotes pour une délétion de ce récepteur a montré que des défauts dans le remodelage du système vasculaire du sac vitellin apparaissent au moment de la mise en place du flux sanguin. Pour discriminer les défauts induits par la perte de fonction de la neuropiline-1 de ceux secondaires à une perfusion anormale, nous avons cultivé les embryons *ex utero* en absence de flux sanguin. Ces embryons « no flow » ont été créés par une incision au niveau du cœur, empêchant la circulation embryonnaire. Ils peuvent survivre jusqu'à 24 heures dans une chambre rotative et leur réseau vasculaire est analysé par marquage immunohistochimique. Nous avons observé que des anomalies de développement du réseau vasculaire chez les embryons neuropiline-1 KO se développaient en absence de flux sanguin. De plus, l'injection d'un anticorps bloquant la liaison du VEGF à la neuropiline-1 dans des embryons sauvages reproduisait les anomalies du développement vasculaire. Une analyse de la migration des cellules endothéliales a montré que les cellules des embryons knockout étaient incapables de migrer à travers la matrice extracellulaire mais restaient piégées dans les vaisseaux déjà formés, formant ainsi des vaisseaux anormalement élargis et dépourvus de points de branchement. Ces données montrent que les défauts du développement vasculaire chez les embryons neuropiline-1 knockout sont causés par la perte de fonction du récepteur et ne sont pas secondaires à une perfusion vasculaire anormale. Ce système relativement simple peut être appliqué aux nombreux mutants chez lesquels des défauts hémodynamiques sont suspectés.

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

29 Équipe : S. Germain, C. Monnot, L. Muller, A. Barret, C. Ardidie-Robouant, J. Philippe, M. Lesage, E. Etienne, E. Gomez, A. Cazes, A. Galaup, N. Bréchot, J. Verine, M. Bignon, S. Gauvrit, M. Durand.

30 Moduler l'angiogenèse, la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux préexistants, est une approche thérapeutique prometteuse dans de nombreuses situations pathophysiologiques, notamment dans le cancer et l'ischémie cardiovasculaire. L'hypoxie est un stimulus majeur de l'angiogenèse. Le but de notre équipe est i) la recherche de nouveaux gènes par deux approches complémentaires, transcriptomique et protéomique et ii) l'étude de leur rôle au cours de l'hypoxie cellulaire ou tissulaire ainsi que dans la régulation des différentes étapes de l'angiogenèse réactionnelle.

31 Cette étude a été initiée par le criblage différentiel des ARNm (cDNA RDA) de cellules endothéliales soumises à un stress hypoxique par rapport aux mêmes cellules cultivées en condition témoin (normoxie). Trois cent gènes dont l'expression est induite par l'hypoxie ont été identifiés. Les résultats de ce criblage ont été vérifiés par des approches complémentaires telles que l'hybridation de puces cDNA, sur lesquelles ont été immobilisés les cDNAs issus du criblage. L'analyse statistique des puces nous a permis de vérifier de façon globale l'induction par l'hypoxie d'une majorité de gènes issus du criblage et d'identifier des gènes dont les rôles dans les mécanismes de régulation de l'angiogenèse par l'hypoxie ne sont pas ou peu connus : l'*IGF-Binding Protein 3*, la neuritine et la *Thioredoxin-interacting protein*. L'hybridation *in situ* nous a permis de caractériser l'expression de ces gènes apportant ainsi la preuve de la validité du criblage et la pertinence de certains marqueurs dans les tissus hypoxiques et angiogéniques (Le Jan *et al.*, 2006, *FEBS Lett.* **580** : 3395-3400).

32 Afin d'étudier la fonction de certains gènes, les critères de choix suivants ont été appliqués : 1) constituent-ils des marqueurs de pathologies (ischémie des membres inférieurs ou cancer) ? 2) Sont-ils des cibles thérapeutiques potentielles (protéines sécrétées ou récepteurs) ? 3) Comment sont-ils susceptibles de moduler la réponse angiogénique ?

33 Les gènes *tsp1* et *angptl4* étaient les gènes dont l'expression était la plus fortement induite, à la fois après criblage cDNA RDA et analyse de puces cDNA. Leur expression était accrue dans des pièces d'amputation de patients souffrant d'ischémie critique des membres inférieurs ainsi que dans les pathologies tumorales (Le Jan, 2003). Nos efforts se sont donc concentrés sur l'étude de la fonction d'*Angiopoietin-like 4* (ANGPTL4) et de la thrombospondine-1 (TSP1).

34 ANGPTL4 appartient à la famille des angiopoïétines, protéines impliquées dans la maturation et la stabilisation des vaisseaux ainsi que dans le développement du système cardiovasculaire. Nous avons montré que l'expression de ce gène est induite par l'hypoxie dans les cellules endothéliales. L'ARNm d'ANGPTL4 est aussi exprimé spécifiquement dans les cellules tumorales des cancers conventionnels du rein (ou à cellules claires) pour lesquels ce gène constitue un marqueur diagnostique (Le Jan *et al.*, 2003, *Am J Pathol* **162** : 1521-28). Puis, nous avons montré qu'ANGPTL4 est une protéine sécrétée dans les cultures primaires de cellules endothéliales humaines issues de

macro- ou de microvaisseaux, soumises à l'hypoxie. ANGPTL4 est présente sous deux formes distinctes : 1) ANGPTL4 soluble, présente dans le milieu de culture et soumise à une protéolyse extracellulaire (forme longue de 55 kDa et courte, protéolysée, de 35 kDa) 2) ANGPTL4 matricielle, associée à la matrice extracellulaire subendothéliale et non protéolysée (55 kDa). Cette forme matricielle interagit très fortement avec la matrice extracellulaire, en particulier par l'intermédiaire des héparanes sulfates protéoglycans. *In vivo*, une accumulation de la forme entière d'ANGPTL4 est observée dans les muscles ischémiques dans un modèle murin d'ischémie de patte (ligature-excision de l'artère fémorale) suggérant qu'ANGPTL4 pourrait exercer un rôle modulateur de l'angiogenèse sur les cellules de la paroi vasculaire dans un contexte hypoxique. Les analyses fonctionnelles réalisées *in vitro* ont confirmé cette hypothèse. L'interaction matricielle d'ANGPTL4 participe à la constitution d'un réservoir de molécules bioactives qui inhibe la migration et l'adhésion des cellules endothéliales, au cours de processus hypoxiques. Ces évènements s'accompagnent d'un étalement intermédiaire des HUVEC, associé à une modification du cytosquelette objectivée par une diminution des fibres de stress et des points focaux d'adhésion. Enfin, ANGPTL4 matricielle inhibe le bourgeonnement endothélial et la formation de tubes (Cazes *et al.*, 2006, *Circ Res* **99** : 1207-15).

35 ANGPTL4 étant induit par l'hypoxie et interagissant avec la matrice extracellulaire, cette protéine pourrait modifier le micro-environnement tumoral et ainsi affecter les cellules tumorales mais aussi les cellules endothéliales intratumorales. La technique d'électrotransfert d'ADN a été utilisée pour exprimer ANGPTL4
in vivo chez la souris. Nous avons montré que les cellules de carcinome pulmonaire 3LL xénogreffées sous la peau de souris et les cellules de mélanome murin B16F0 injectées dans le sinus rétro-orbital, développent moins de métastases pulmonaires chez les souris électrotransférées avec ANGPTL4 que chez les souris contrôle. Les cellules B16 forment des nodules qui restent intravasculaires au niveau pulmonaire, montrant qu'ANGPTL4 inhibe aussi le processus d'extravasation. De plus, ANGPTL4 inhibe la perméabilité vasculaire dans un test de Miles en réponse à l'histamine. *In vitro*, l'expression d'ANGPTL4 dans les cellules B16 inhibe leurs propriétés de migration, d'invasion et d'adhésion. Ces phénomènes s'accompagnent d'une désorganisation du cytosquelette d'actine des cellules exprimant ANGPTL4. La formation de points focaux d'adhésion est aussi fortement réduite. Ces résultats montrent qu'ANGPTL4 inhibe les processus métastatiques en affectant la perméabilité vasculaire et les propriétés de motilité et d'invasion des cellules tumorales (Galaup *et al.*, 2006, *PNAS* **103** : 18721-726).

36 L'analyse des caractéristiques moléculaires et fonctionnelles de l'interaction d'ANGPTL4 avec la matrice extracellulaire a été étudiée (36), car la modulation de ces interactions peut contrôler la biodisponibilité d'ANGPTL4 dans les pathologies ischémiques, tumorales et cardiovasculaires. Les analyses des cibles moléculaires (récepteurs, intégrines) et cellulaires (cellules de la paroi vasculaire ou cellules tumorales) ainsi que l'étude des souris invalidées pour le gène (*angptl4* KO), disponibles au laboratoire, est en cours.

37 Dans le cadre d'un réseau INSERM dédié à l'étude des cellules souches, nous avons étudié le transcriptome ainsi que les propriétés angiogéniques de progéniteurs endothéliaux circulants adultes (Smajda *et al.*, 2007, *J Cell Mol Med* **11** : 1149-61 ; 26).

38 L'objectif de l'équipe est aussi d'analyser les modifications du microenvironnement vasculaire dans un contexte hypoxique, par une analyse des protéines de la matrice

extracellulaire produite par les cellules endothéliales *in vitro*. Les processus angiogéniques s'accompagnent d'un profond remodelage matriciel qui consiste aussi bien en la dégradation de la matrice extracellulaire en place qu'en l'établissement d'une matrice provisoire associée aux phénomènes dynamiques de migration cellulaire, puis à la formation d'une lame basale permettant la stabilisation du vaisseau néoformé. Le remodelage matriciel résulte donc à la fois des variations d'expression de gènes et des modifications post-traductionnelles des protéines exprimées. Dans ce contexte, il est important d'analyser le « sous-protéome » matriciel et en particulier l'expression de certains constituants matriciels, notamment des protéines matricellulaires auxquelles ANGPTL4 est apparentée. Les cellules endothéliales expriment effectivement certains membres de cette famille tels que les CCN (Cyr61, Nov et CTGF), l'ostéonectine (SPARC) ou la thrombospondine 1 (TSP1) et IGFBP3. Le profil d'expression de Cyr61, Nov, TSP1 et ANGPTL4 a été établi au laboratoire dans le milieu de sécretion et la MEC de cultures primaires d'HUVEC (Cazes *et al.*, 2006, *Circ Res* **99** : 1207-15).

39 En ce qui concerne la TSP1, son rôle d'inhibiteur de l'angiogenèse est connu depuis de nombreuses années. Mais alors, comment expliquer l'expression accrue d'une protéine aux propriétés anti-angiogéniques dans une situation d'ischémie chronique lors de l'arthériopathie des membres inférieurs où on s'attendrait, au contraire, à la mise en place d'un programme d'expression de gènes à activité pro-angiogénique, visant à compenser cette ischémie. La TSP1 est une glycoprotéine matricellulaire multifonctionnelle interagissant avec de nombreux composants de la matrice extracellulaire. Cette protéine trimérique de 450kDa est impliquée dans l'inflammation, la réparation tissulaire, l'hémostase et l'angiogenèse. Cependant, peu de données sont connues sur son rôle dans les pathologies ischémiques. Au cours des processus inflammatoires et cicatriciels post-infarctus, la TSP1, présente au sein de la matrice extracellulaire, inhibe l'étendue de la fibrose. Au cours de l'année dernière, de nombreuses publications de la même équipe (*Center for Cancer Research*, NIH) ont montré que la TSP1, en se liant à CD47, inhibe la signalisation NO, la synthèse de GMPc, induit la constriction des vaisseaux sanguins, accélère l'agrégation plaquettaire et inhibe ainsi l'angiogenèse post-ischémique. Dans l'artériopathie oblitérante des membres inférieurs chez l'homme, nous avons montré que la TSP1 est très fortement exprimée dans la partie ischémique du muscle de patients amputés pour cause d'ischémie critique des membres inférieurs. Nous avons mis au point au laboratoire un modèle d'ischémie critique des membres inférieurs (triple ligature de l'artère fémorale qui nous a permis de décrire l'expression de la nétrine et de son récepteur unc5B), chez des souris dont le gène codant pour la TSP1 est invalidé. Dans le cadre du réseau EVGN (*European Vascular Genomics Network*), nous avons étudié la revascularisation post-ischémique des souris KO par rapport aux souris sauvages et montré que ces souris tsp1 KO sont protégées de la nécrose post-ischémique. Partant d'observations cliniques qui ont clairement montré que les marqueurs pro-inflammatoires sont corrélés avec la progression de la maladie et le risque d'amputation et que la TSP1 est exprimée par les macrophages infiltrant le tissu ischémique, le profil d'activation des macrophages infiltrant le tissu ischémique a été analysé. Ceux-ci expriment le marqueur Ly-6C (polarisation pro-inflammatoire M1) et sont doués de capacité de phagocytose importante chez les souris sauvages alors que le ly-6C est beaucoup moins exprimé chez les KO, signe d'une polarisation alternative moins inflammatoire. De plus, ces derniers phagocytent beaucoup moins efficacement les myoblastes nécrosés. Nous avons confirmé, par RT-PCR et Elisa un profil d'expression de cytokines qui est moins pro-inflammatoire des macrophages souris *tsp1*

KO par rapport aux sauvages. Enfin, la déplétion des monocytes circulants par du clodronate encapsulé dans des liposomes abolit la protection observée chez les souris *tsp1* KO. Cette étude démontre donc que cibler l'état d'activation des macrophages dans un tissu ischémique est une nouvelle stratégie thérapeutique pour protéger le tissu de la nécrose et promouvoir sa régénération via l'inhibition de la phagocytose et/ou de la TSP1 (23).

40 Parallèlement à cette caractérisation de protéines matricellulaires candidates, une approche protéomique différentielle, sans *a priori*, a été réalisée par séparation des protéines en électrophorèse bidimensionnelle sur la MEC de cultures primaires de cellules endothéliales de micro- et macrovaisseaux cultivées en normoxie ou hypoxie. Cette approche permet l'analyse de facteurs bioactifs associés aux composants structuraux de la MEC. Ainsi, nous avons identifié par spectrométrie de masse des protéases et des enzymes de pontage et de réticulation de la MEC. Certaines de ces protéines sont accumulées dans la MEC subendothéliale hypoxique, en association avec des réseaux de collagènes et de laminines. L'expression de ces protéines est aussi fortement augmentée dans les tissus ischémiques de pattes de souris ligaturées. Les analyses de ces protéines de pontage de la MEC se poursuivent afin de déterminer leur rôle dans le remodelage matriciel et les réponses angiogéniques des cellules vasculaires.

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

III – Angiogenèse normale et pathologique

42 Équipe : P. Corvol, A. Michaud, G. Nguyen, F. Lebrin, A. Bessonnat, C. Cousin, D. Bracquard, S. Srun, S. Martin, H. Kempf, I. Queguiner, M. Leroux-Berger, J. Sainz, T. Trovati-Maciel, E. Larger, N. Lamandé, S. Calderari, M. Fysekidis, C. Chougnet, G. Nguyen, F. Lebrin.

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

1. Fonctions de (P)RR (G. Nguyen)

44 Elles se divisent en deux grandes parties :

- les fonctions de (P)RR en rapport avec la système rénine-angiotensine (SRA) ;
- de nouvelles fonctions de (P)RR dans le développement précoce et indépendantes du SRA. Ce travail est réalisé avec l'aide de Franck Lebrin, CR1 Inserm qui possède une grande expérience des cellules souches embryonnaires.

1.1. (P)RR et système rénine-angiotensine (SRA)

45 Nous avons montré que (P)RR existait sous une forme soluble générée par clivage de la forme native dans le trans-Golgi et par une proconvertase, probablement la furine. Cette forme soluble est retrouvée dans le milieu conditionné des cellules en culture mais surtout dans le plasma humain et de rat (28) et sa fonction est en cours d'étude. Nous avons obtenu un financement Inserm/Direction de l'Hospitalisation et de

l'organisation des soins (DHOS, 100 k€ pour 2009-2010) et une subvention de la Société française d'hypertension artérielle (20 k€) afin de mettre au point un ELISA pour mesurer le (P)RR soluble dans les pathologies associées à une activation du SRA, en collaboration avec M. Azizi, directeur du Centre d'investigation clinique de l'hôpital européen Georges Pompidou à Paris. Nous avons également obtenu un financement de l'Inserm et de la *Deutsche Forschungsgemeinschaft* pour une étude en réseau avec les équipes de D. Muller et M. Bader au *Max Delbruck Center for Molecular Medicine* à Berlin afin d'étudier l'implication du (P)RR dans la néphropathie diabétique et au cours du développement rénal (P2R franco-allemand, 2008-2009). D'autre part nous avons un contrat d'alliance avec l'Institut de recherche Servier (220 k€ , 2008-2009) afin d'étudier des inhibiteurs du site actif de la prorénine et leur effet potentiel sur la liaison prorénine/(P)RR.

1.2. Fonctions de (P)RR indépendantes du SRA

46 Nous venons de montrer que le (P)RR est exprimé abondamment dans le cerveau, dans les noyaux impliqués dans la régulation centrale de la pression artérielle et dans la plupart des neurones. La transfection de (P)RR muté, responsable d'un retard mental et d'épilepsie, entraîne un défaut de la différenciation des cellules neuroendocrines en neurones induite par le *Nerve Growth Factor* (27). Nous sommes en train d'étudier le rôle de (P)RR au cours de la neurogenèse par une combinaison d'approches associant la génétique chez la souris et la différenciation des cellules souches embryonnaires en corps embryoïdes. D'autre part, des résultats préliminaires indiquent que l'invalidation du *(P)RR* dans les cellules souches embryonnaires de souris entraîne une perte de la pluripotence et induit leur différenciation. Nous essayons d'établir le rôle du (P)RR dans le maintien de la pluripotence des cellules souches embryonnaires.

2. Fonctions de la signalisation TGFβ (F. Lebrin)

47 La télangectasie hémorragique héréditaire (HHT) est une maladie vasculaire autosomique dominante causée par des mutations des gènes codant pour endogline et ALK1, deux récepteurs de la signalisation du TGFβ exprimés dans les cellules endothéliales. Les symptômes cliniques incluent des télangiectasies au niveau des muqueuses et de la peau, lésions qui se caractérisent par une lumière dilatée du vaisseau et des défauts de recouvrement par les cellules murales. La majorité des patients HHT développe de sévères et fréquents saignements de nez associés à ces lésions qui posent un problème thérapeutique majeur.

48 Nous sommes en train de générer des modèles de différenciation de cellules souches embryonnaires (ESC) et de cellules souches pluripotentes induites (iPS) murines et humaines de la maladie pour étudier les mécanismes responsables du développement de cette pathologie et rechercher des molécules potentiellement utilisables en thérapeutique. Dans ce contexte, nous venons de démontrer que la thalidomide, une molécule anti-angiogénique, était capable de réduire la sévérité et le nombre de saignements chez un groupe de patients HHT. Le mécanisme repose sur une stimulation du recrutement des cellules murales au niveau des vaisseaux sanguins stabilisant le réseau vasculaire. Au plan moléculaire, nous montrons que la thalidomide stimule la production de PDGFβ, un médiateur clé de la régulation des cellules murales. Nos

résultats démontrent un nouveau mode d'action de la thalidomide et valident une stratégie utilisable dans le traitement des malformations vasculaires.

3. Angiogenèse et diabète (E. Larger)

49 Le groupe dirigé par E. Larger s'intéresse à la pathologie de l'angiogenèse dans les maladies métaboliques, diabète et obésité, depuis l'arrivée du Dr. E. Larger au Collège, en 2001. Ayant d'abord travaillé sur la pathologie de l'angiogenèse liée à l'hyperglycémie chronique dans un modèle original, l'embryon de poulet (membrane chorioallantoïde et coronaires), le groupe a évolué dans deux directions :

- angiogenèse du tissu adipeux, en utilisant le modèle de la membrane chorioallantoïde de poulet pour étudier l'angiogenèse de tissu adipeux humain, obtenu chez des patients ayant une obésité morbide (19) ;
- angiogenèse des îlots de Langerhans du pancréas. Ce thème est le thème principal du groupe.

50 Les îlots de Langerhans du pancréas sont au cœur des syndromes diabétiques, puisque la perte de fonction des cellules β, qui sécrètent l'insuline a un rôle causal dans toutes les formes de diabète. Au cours du diabète de type 2, la forme la plus fréquente de la maladie, associée à l'âge et au surpoids, mais aussi à tous les autres facteurs de risque de maladie vasculaire, hypertension, dyslipidémie, tabagisme, hérédité, la maladie semble évoluer en 2 temps : compensation insuffisante par les cellules β de la résistance à l'action de l'insuline, puis perte de fonction, associée à une perte anatomique des cellules β.

51 Les cellules β sécrètent de multiples facteurs de croissance vasculaire, qui paraissent nécessaire à une sécrétion correcte de l'insuline, dont toutes les isoformes du VEGF, les angiopoïétines, mais aussi des inhibiteurs de l'angiogenèse, dont la thrombospondine 1. Fait significatif, la densité vasculaire dans les îlots de Langerhans est une des plus élevées de l'organisme. Elle est très significativement supérieure à celle du pancréas exocrine qui entour les îlots, et ceci s'associe à l'expression du récepteur R2 du VEGF spécifiquement dans les îlots.

52 Notre hypothèse de travail est que des phénomènes vasculaires peuvent être en cause dans la perte de fonction qui caractérise les phases tardives du diabète de type 2, dues soit à la perte de sécrétion des peptides vasoactifs, soit à l'absence de réponse endothéliale à ces signaux nécessaires à une sécrétion optimale de l'insuline.

53 Chez les femmes prédisposées au diabète de type 2, c'est souvent pendant les grossesses, plusieurs décennies avant le diabète, que se sont révélés les premières anomalies métaboliques.

54 Nous avons ainsi choisi de travailler sur les relations endothélium-cellules endocrines du pancréas dans trois modèles :

- angiogenèse du pancréas au cours de la gestation chez la souris ;
- angiogenèse des cellules endocrines dans le modèle de la membrane chorioallantoïde de poulet, en utilisant des lignées cellulaires de cellules β ;
- chimères poulet-souris, obtenues après greffe de pancréas de poulet sous la capsule rénale de souris SCID, modèle dans lequel l'angiogenèse est modulée par la sur ou la sous-expression de facteurs de croissance au moyen de rétrovirus spécifiques des cellules aviaires.

55 remiers projets ont récemment débuté. Dans le modèle de chimère poulet-oiseau, nos résultats préliminaires suggèrent un rôle critique à la fois du VEGF, et de l'angiopoïétine-2 dans la régulation de la vascularisation, mais aussi de la fonction du pancréas endocrine.

4. Calcifications vasculaires (H. Kempf)

56 Lors du développement embryonnaire, les os se forment à partir de cellules mésenchymateuses (cellules de la crête neurale ou cellules mésodermiques) suivant deux voies d'ossification très distinctes. L'ossification dite (intra)membranaire correspond à la différentiation directe *in situ* des cellules progénitrices en ostéoblastes. Le second processus, appelé ossification endochondrale, comprend la formation de cartilage qui est remplacé par la suite par des cellules osseuses après invasion vasculaire. Chacun de ces deux processus d'ossification est très étroitement régulé par des facteurs de croissance solubles, leurs récepteurs et des facteurs de transcription, chacun intervenant à une étape précise de la cascade moléculaire assurant la différentiation ostéoblastique ou chondro-ostéoblastique.

57 Il apparaît que des processus similaires sont reproduits chez l'adulte lors de la réparation osseuse à la suite d'une fracture ou lors de l'apparition de calcifications ectopiques dans les vaisseaux. Ces dernières sont fréquemment observées avec l'âge et comme complications lors de pathologies comme l'athérosclérose, le diabète, l'hypercholestérolémie, ou encore l'insuffisance rénale. Bien que longtemps considérées comme bénignes, il est désormais clair que ces calcifications vasculaires ont des conséquences cliniques délétères et représentent par conséquent des indicateurs importants de morbi-mortalité cardiovasculaire.

58 Il apparaît donc évident qu'une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans l'initiation et la progression de cette pathologie est essentielle pour améliorer la prévention et le traitement de cette maladie importants.

59 Selon les conditions pathologiques, l'ossification intramembranaire ou endochondrale est à l'origine de la calcification vasculaire. Bien que la physiopathologie de ces calcifications soit bien documentée, peu de choses sont connues sur les processus moléculaires impliqués dans leur formation et leur développement dans la paroi artérielle. Dans ce contexte, le but de notre projet est :

- d'étudier les signaux et facteurs de transcription responsables de la formation ectopique de cartilage et d'os dans les artères, grâce à l'analyse de modèles d'animaux présentant des calcifications vasculaires importantes ;
- de déterminer, en culture mais également *in vivo*, les rôles et interactions spécifiques de ces molécules dans la transition phénotypique des cellules musculaires lisses en cellules cartilagineuses ou ostéoblastiques ;
- d'identifier et de caractériser des nouveaux régulateurs impliqués dans la minéralisation de la matrice des cellules musculaires vasculaires.

60 Nos travaux portent principalement sur le modèle des souris dépourvus de Matrix gla protein (Mgp, une protéine γ-carboxylée de la MEC) qui présente spontanément des calcifications vasculaires importantes, démontrent un rôle crucial de la signalisation des *Bone Morphogenetic proteins* (BMPs) dans l'apparition de cellules cartilagineuses dans la paroi artérielle de ces souris. Cependant, de façon surprenante, nous avons également pu démontrer que l'initiation de la minéralisation de la paroi apparaissant

dans ces souris 3 jours après la naissance précédait l'apparition de cartilage ectopique induite par les BMPs. Ainsi il apparaît que les processus d'initiation de la calcification sont dans ce modèle indépendant de la présence de cellules de type cartilagineuse qui apparaissent plus tardivement, ou ostéoblastique, ces dernières n'ayant été détectées à aucune étape du développement des lésions. Des résultats obtenus récemment suggèrent fortement que la réactivation de l'alkaline phosphatase (enzyme cruciale dans la minéralisation du squelette embryonnaire) dans les cellules musculaires lisses vasculaires des souris mutées serait seule responsable de la minéralisation pathologique observée. Si cette observation est confirmée, elle permettrait de démontrer qu'une transdifférentiation des cellules musculaires lisses vasculaires n'est pas obligatoire pour que la paroi artérielle minéralise et proposerait une nouvelle cible thérapeutique pour bloquer très précocement l'apparition et le développement de ces calcifications chez les sujets à risque.

Publications du laboratoire 2008-2009

61 1. Feldman D.L., Jin L., Xuan H., Contrepas A., Zhou Y., Webb R.L., Mueller D.N., Feldt S., Cumin F., Maniara W., Persohn E., Schuetz H., Jan Danser A.H. and Nguyen G. Effects of Aliskiren on blood pressure, albuminuria, and (pro)renin receptor expression in diabetic TG(mREN-2)27 rats. Hypertension 52: 130-136, 2008.

2. Feldt S., Batenburg W.W., Mazak I., Maschke U., Wellner M., Kvakan H., Dechend R., Fiebeler A., Burckle C., Contrepas A., Jan Danser A.H., Bader M., Nguyen G., Luft F.C. and Muller D.N. Prorenin and renin-induced extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation in monocytes is not blocked by aliskiren or the handle-region peptide. Hypertension 51: 682-688, 2008.

3. Batenburg W.W., De Bruin R.J., Van Gool J.M., Müller D.N., Bader M., Nguyen G. and Danser A.H. Aliskiren-binding increases the half life of renin and prorenin in rat aortic vascular smooth muscle cells. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 28: 1151-1157, 2008.

4. Zingg-Schenk A., Bacchetta J., Corvol P., Michaud A., Stallmach T., Cochat P., Gribouval O., Gubler M.-C. and Neuhaus T.J. Inherited renal tubular dysgenesis: the first patients surviving the neonatal period. Eur. J. Pediatr. 167: 311-316, 2008.

5. Sluimer J., Gasc J.-M., Hamming I., Van Goor H., Michaud A., Van Den Akker L., Jütten B., Cleutjens J., Bijnens A., Corvol P., Daemen M. and Heeneman S. Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) expression and activity in human carotid atherosclerotic lesions. J. Pathol. 215: 273-279, 2008.

6. Sluimer J.C., Gasc J.-M., Van Wanroij J.L., Kisters N., Groeneweg M., Sollewijn Gelpke M.D., Cleutjens J.P., Van Den Akker L.H., Corvol P., Wouters B.G., Daemen M.J. and Bijnens A.P. Hypoxia, hypoxia-inducible transcription factor, and macrophages in human atherosclerotic plaques are correlated with intraplaque angiogenesis. J. Am. Coll. Cardiol. 51: 1258-1265, 2008.

7. Hamming I., Van Goor H., Turner A.J., Rushworth C.A., Michaud A., Corvol P. and Navis G. Differential regulation of renal angiotensin-converting enzyme (ACE) and ACE2 during ACE inhibition and dietary sodium restriction in healthy rats. Exp. Physiol. 93: 631-638, 2008.

8. Fuchs S., Xiao H.D., Hubert C., Michaud A., Campbell D.J., Adams J.W., Capecchi M.R., Corvol P. and Bernstein K.E. Angiotensin-converting enzyme C-terminal catalytic

domain is the main site of angiotensin I cleavage in vivo. Hypertension 51: 267-274, 2008.
9. David L., Mallet C., Keramidas M., Lamande N., Gasc J.-M., Dupuis-Girod S., Plauchu H., Feige J.J. and Bailly S. Bone morphogenetic protein-9 is a circulating vascular quiescence factor. Circ. Res. 102: 914-922, 2008.
10. Sabaa N., De Franceschi L., Bonnin P., Castier Y., Malpeli G., Debbabi H., Galaup A., Maier-Redelsperger M., Vandermeersch S., Scarpa A., Janin A., Levy B., Girot R., Beuzard Y., Leboeuf C., Henri A., Germain S., Dussaule J.-C. and Tharaux P.L. Endothelin receptor antagonism prevents hypoxia-induced mortality and morbidity in a mouse model of sickle-cell disease. J. Clin. Invest. 118: 1924-1933, 2008
11. Thaunat O., Louedec L., Graff-Dubois S., Dai J., Groyer E., Yacoub-Youssef H., Mandet C., Bruneval P., Kaveri S., Caligiuri G., Germain S., Michel J.-B. and Nicoletti A. Antiangiogenic treatment prevents adventitial constrictive remodeling in graft arteriosclerosis.Transplantation 85: 281-289, 2008.
12. Freitas C., Larrivee B. and Eichmann A. Netrins and UNC5 receptors in angiogenesis. Angiogenesis 11: 23-29, 2008.
13. Bouvree K., Larrivee B., Lv X., Yuan Y., Delafarge B., Freitas C., Mathivet T., Breant C., Tessier-Lavigne M., Bikfalvi A., Eichmann A. and Pardanaud L. Netrin-1 inhibits sprouting angiogenesis in developing avian embryos. Dev. Biol. 318: 172-183, 2008.
14. Jones E.A.V., Yuan L., Bréant C., Watts R.J. and Eichmann A., Separating genetic and hemodynamic defects in neuropilin-1 knockout embryos. Development 135: 2479-2488, 2008.
15. Krebs C., Weber M., Steinmetz O., Meyer-Schwesinger C., Stahl R.,
Danser A.H., Garrelds I., van Goor H., Nguyen G., Müller D. and Wenzel U. Effect of (pro)renin receptor inhibition by a decoy peptide on renal damage in the clipped kidney of Goldblatt rats. Kidney Int. 74: 823-824, 2008.
16. Danser A.J. and Nguyen G. The Renin Academy Summit: advancing the understanding of renin science. Renin Angiotensin Aldosterone Syst. 9: 119-123, 2008.
17. Eyries M., Siegfried G., Ciumas M., Montagne K., Agrapart M., Lebrin F. and Soubrier F. Hypoxia-induced apelin expression regulates endothelial cell proliferation and regenerative angiogenesis. Circ. Res. 103: 432-440, 2008.
18. Braam S.R., Zeinstra L., Litjens S., Ward-van Oostwaard D., van den Brink S., van Laake L., Lebrin F., Kats P., Hochstenbach R., Passier R., Sonnenberg A. and Mummery C.L. Recombinant vitronectin is a functionally defined substrate that supports human embryonic stem cell self-renewal via alphavbeta5 integrin. Stem Cells. 26: 2257-2265, 2008.
19. Ledoux S., Queguiner I., Msika S., Calderari S., Rufat P., Gasc J.-M., Corvol P. and Larger E. Angiogenesis associated with visceral and subcutaneous adipose tissue in severe human obesity. Diabetes 57: 3247-3257, 2008.
20. Ledoux S. and Larger E. Nutritional deficiencies after Roux-en-Y gastric bypass can be prevented by standard multivitamin supplementation. Am. J. Clin. Nutr. 88: 1176; author reply 1176-1177, 2008.
21. Di Marco G.S., Alam A., Dol F., Corvol P., Gasc J.-M. and Larger E. Angiogenesis and diabetes: different responses to pro-angiogenic factors in the chorioallantoic membrane assay. Mol. Med. 14: 705-714, 2008.
22. Tammela T., Zarkada G., Murtomäki A., Wallgard E., Suchting S., Wirzeius M., Waltari M., Hellstrom M., Schomber T., Peltonen R., Duarte A., Freitas C., Isonemi H., Laakonen P., Christofori G., Yla-Hertuala S., Shibuya M., Pytowski B., Eichmann A.,

Betsholtz C. and Alitalo K. Inhibition of VEGFR-3 suppresses angiogenic sprouting and vascular network formation. Nature 454: 656-660, 2008.
23. Bréchot N., Gomez E., Bignon M., Khallou-Laschet J., Dussiot M., Cazes A., Alanio-Bréchot C., Durand M., Philippe J., Silvestre J.S., Van Rooijen N., Corvol P., Nicoletti A., Chazaud B. and Germain S. Modulation of macrophage activation state protects tissue from necrosis during critical limb ischemia in thrombospondin-1-deficient mice. PloS ONE 3: e3950, 2008.
24. Alliouachene S., Tuttle R.L., Boumard S., Lapointe T., Berissi S., Germain S., Jaubert F., Tosh D., Birnbaum M.J. and Pende M. Constitutively active Akt1 expression in mouse pancreas requires S6 kinase 1 for insulinoma formation. J. Clin. Invest. 118: 3629-3638, 2008.
25. Allen A.M., O'Callaghan E.L., Hazelwood L., Germain S., Castrop H., Schnermann J. and Bassi J.K. Distribution of cells expressing human renin-promoter activity in the brain of a transgenic mouse. Brain Res. 1243: 78-85, 2008.
26. Smadja D.M., Bièche I., Silvestre J.S., Germain S., Cornet A., Laurendeau I., Duong-Van-Huyen J.P., Emmerich J., Vidaud M., Aiach M. and Gaussem P. Bone Morphogenetic Proteins 2 and 4 Are Selectively Expressed by Late Outgrowth Endothelial Progenitor Cells and Promote Neoangiogenesis. Arterioscler Thromb. Vasc. Biol. 28: 2137-2143, 2008.
27. Contrepas A., Walker J., Koulakoff A., Franek K.J., Qadri F., Giaume C.B., Corvol P., Schwartz C.E. and Nguyen G. A role of the (pro) renin receptor in neuronal cell differentiation. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 2009 May 27 [Epub ahead of print].
28. Cousin C., Bracquart D., Contrepas A., Corvol P., Muller L. and Nguyen G. Soluble form of the (pro)renin receptor generated by intracellular cleavage by furin is secreted in plasma. Hypertension 53: 1077-1082, 2009.
29. Gratze P., Boschmann M., Dechend R., Qadri F., Malchow J., Graeske S., Engeli S., Janke J., Springer J., Contrepas A., Plehm R., Klaus S., Nguyen G.,
Luft F.C. and Muller D.N. Energy metabolism in human renin-gene transgenic rats: does renin contribute to obesity? Hypertension 53: 516-523, 2009.
30. Bot P.T., Hoefer I.E., Sluijter J.P., van Vliet P., Smits A.M., Lebrin F., Moll F., de Vries J.P., Doevendans P., Piek J.J., Pasterkamp G. and Goumans M.J. Increased expression of the transforming growth factor-beta signaling pathway, endoglin, and early growth response-1 in stable plaques. Stroke 40:439-447, 2009.
31. Yvan-Charvet L., Massiera F., Lamande N., Ailhaud G., Teboul M., Moustaid-Moussa N., Gasc J.-M. and Quignard-Boulange A. Deficiency of angiotensin type 2 receptor rescues obesity but not hypertension induced by overexpression of angiotensinogen in adipose tissue. Endocrinology 150: 1421-1428, 2009.
32. Vincent F., Bonnin P., Clemessy M., Contreres J.O., Lamande N., Gasc J.-M., Vilar J., Hainaud P., Tobelem G., Corvol P. and Dupuy E. Angiotensinogen delays angiogenesis and tumor growth of hepatocarcinoma in transgenic mice. Cancer Res. 69: 2853-2860, 2009.
33. Coupaye M., Puchaux K., Bogard C., Msika S., Jouet P., Clerici C., Larger E. and Ledoux S. Nutritional consequences of adjustable gastric banding and gastric bypass: a 1-year prospective study. Obes. Surg. 19: 56-65, 2009.
34. Suchting S. and Eichmann A. Jagged gives endothelial tip cells an edge. Cell 137: 988-990, 2009.

35. Larrivée B., Freitas C., Suchting S., Brunet I. and Eichmann A. Guidance of vascular development: lessons from the nervous system. Circ. Res. 104: 428-441, 2009.
36. Chomel C., Cazes A., Faye C., Bignon M., Gomez E., Ardidie-Robouant C., Barret A., Ricard-Blum S., Muller L., Germain S. and Monnot C. Interaction of the coiled-coil domain with glycosaminoglycans protects angiopoietin-like 4 from proteolysis and regulates its antiangiogenic activity. FASEB J. 23: 940-949, 2009.

Revues, Ouvrages

62 Nguyen G. and Danser A.H. Prorenin and (pro)renin receptor: a review of available data from in vitro studies and experimental models in rodents. Exp. Physiol. 93: 557-563, 2008.

Corvol P., Michaud A., Gribouval O., Gasc J.-M. and Gubler M-C. Can we live without a functional renin-angiotensin system? Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 35: 431-433, 2008.
Nguyen G. and Contrepas A. The (pro)renin receptors. J. Mol. Med. 86: 643-646, 2008.
Nguyen G. and Contrepas A. Physiology and pharmacology of the (pro)renin receptor. Curr. Opin. Pharmacol. 8: 127-132, 2008.
Eichmann A., Bouvrée K. and Pardanaud L. Vasculogenesis and angiogenesis in development. In: Tumor angiogenesis: basic mechanisms and cancer therapy. Marmé D., Fusenig N. (eds.). Springer-Verlag, 31-47, 2008.
Galaup A. and Germain S. [Blocking PlGF, a future in anti-angiogenic therapy?] Med Sci (Paris) 24: 459-462, 2008.
Lebrin F. and Mummery C.L. Endoglin-mediated vascular remodeling: mechanisms underlying hereditary hemorrhagic telangiectasia. Trends Cardiovasc. Med. 18 : 25-32, 2008.

Contrats européens

63 EVGN « European Vascular Genomics Network » - Responsable : S. Germain – 52.440 € (2004-2008).

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

Liste des diplômés

Thèses

64 Clémence Chomel : Thèse de Doctorat d'Université Paris VI, spécialité : Physiologie et physiopathologie, soutenue le 12 novembre 2008 : « Caractérisation des mécanismes de régulation de l'activité angiogénique de l'Angiopoietin-like 4 dans la matrice extracellulaire endothéliale »

Master 2

65 Nathan Bekhouche : Master 2 – Biologie moléculaire et cellulaire, université Paris VI, soutenu le 18 juin 2009 : « Transglutaminase 2, remodelage de la matrice extracellulaire et angiogenèse. Analyse in vitro et ex vivo ».

NOTES

1. Seules les publications issues des travaux du laboratoire en 2008-2009 sont numérotées (*cf.* liste de publications). Les autres sont référencées dans le texte.

AUTEUR

PIERRE CORVOL

Membre de l'Institut (Académie des sciences), professeur au Collège de France