

UNIVERSITE DE NANTES

FACULTE DE MEDECINE

**IMPORTANCE DE LA VOIE NOTCH DANS LA DYSFONCTION
ENDOTHELIALE EN TRANSPLANTATION : REGULATION ET
FONCTIONS DES RECEPTEURS NOTCH2 ET NOTCH4**

THESE DE DOCTORAT

Ecole Doctorale CHIMIE BIOLOGIE

Discipline : Biologie Médecine Santé

Spécialité : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Présentée et soutenue publiquement par

QUILLARD Thibaut

Le 1^{er} octobre 2008, devant le jury ci-dessous

Président..... Gervaise LOIRAND, Docteur, Nantes

Rapporteurs Jean-Sébastien SILVESTRE, Docteur, Paris

..... Frédéric VELY, Docteur, Marseille

Examineur Frédérique LOGEAT, Docteur, Paris

Directeur de thèse Béatrice CHARREAU, Docteur, Nantes

Sommaire

SOMMAIRE	3
LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX	6
ABREVIATIONS	8
INTRODUCTION.....	10
La Transplantation.....	10
I. Historique	10
II. Problématiques et Enjeux	11
L'Endothélium.....	13
I. Définition.....	13
II. Hétérogénéité.....	14
III. Fonctions générales	16
1. Formation et Remodelage Vasculaire.....	16
2. Hémostase	17
a) La coagulation.....	18
b) La fibrinolyse	18
3. Tonus vasculaire.....	20
4. Inflammation	22
IV. L'Activation Endothéliale au cours de l'inflammation	22
1. Le Processus inflammatoire	22
2. L'Inflammation aiguë.....	23
a) Type 1	23
b) Type 2	25
c) Evolution de l'activation de type 2	28
3. Inflammation chronique	29
a) Rôle de cellules présentatrices d'antigènes.....	29
b) L'angiogenèse.....	29
4. Les CE et l'organogénèse d'organes lymphoïdes tertiaires.....	30
Implication centrale de l'endothélium dans l'artériosclérose du greffon.....	31
I. L'Artériosclérose du greffon	31
1. Définition.....	31
2. Facteurs impliqués dans le développement de l'AG	35
a) Immunologiques	35
Rejets Aigus	35
b) Non immunologiques.....	37

Inflammation	37
Toxicité IS.....	39
Hyperlipidémie, diabète, hypertension	40
Qualité du greffon	40
Infections	40
3. Dysfonction Endothéliale liée à la production de NO.....	41
4. Activation Endothéliale	42
5. Apoptose et Remodelage Vasculaire.....	43
La voie de signalisation Notch	46
I. Présentation générale.....	46
1. Historique	46
2. Structure	46
a) Structure type des récepteurs Notch.....	46
b) Structure des récepteurs Notch	47
c) Structure des ligands de la famille Delta et Serrate	48
II. Activation de la voie de signalisation Notch.....	49
III. Principaux régulateurs de la voie Notch.....	52
1. O-Fucosyltransférase-1 (O-FucT-1 ou Ofut1) et Fringe	52
2. Neuralized (Neur) et Mind Bomb (Mib)	52
3. Epsine, Auxiline	52
4. Numb et Deltex	53
IV. Activation indépendante de CSL.....	53
V. Activation des ligands de la voie Notch : signal bidirectionnel ?.....	54
Fonctions Générales de la voie Notch	55
I. Différenciation cellulaire.....	55
1. Inhibition latérale.....	55
2. Orientation lignage cellulaire	56
3. Induction Latérale.....	56
II. La prolifération et l'apoptose : rôle controversé de Notch dans le développement de tumeurs	56
III. Fonctions croisées entre Notch et autres grandes voies de signalisation.....	59
Rôle de la voie Notch dans les vaisseaux sanguins.....	63
I. Distribution dans les cellules vasculaires	63
II. Fonctions vasculaires de la voie Notch : Implications dans le remodelage vasculaire ?...	64
1. Morphogénèse vasculaire	64
2. Angiogenèse	65

3. Contrôle de la survie et la prolifération des Cellules Endothéliales	68
4. La transition épithélio - mésenchymateuse (EMT)	69
OBJECTIFS DE LA THESE.....	70
Historique du travail de thèse	70
Stratégie de Recherche.....	70
PARTIE EXPERIMENTALE	73
Partie 1	
L'inflammation induit la modification du phénotype Notch dans les Cellules Endothéliales : régulation sélective de Notch 2, 3, 4 et Dll1	73
I. Objectif de l'étude	73
II. Matériel et Méthodes.....	74
III. Résultats	79
Partie 2	
(Article 1, sous presse dans <i>Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology</i>)	
L'inhibition de l'activité de Notch4 induit l'apoptose et l'activation des Cellules Endothéliales : implications dans l'artériosclérose du greffon.....	88
I. Résumé de l'article	88
II. Article.....	89
Partie 3	
(Article 2)	
L'activation de Notch2 dans les Cellules Endothéliales induit l'apoptose en bloquant l'expression de la survivine	121
I. Résumé de l'article	121
II. Article.....	122
DISCUSSION.....	147
BIBLIOGRAPHIE	160
ANNEXES	175
Liste des publications	176
Article Annexe Fitau <i>et al</i>	177
Article Annexe Ashton-Chess <i>et al</i>	178
Article Annexe Chiron <i>et al</i>	179

Liste des figures et tableaux

FIGURE 1. COURBE DE SURVIE DES GREFFONS RENAUX DEPUIS 1985 (AGENCE DE LA BIOMEDECINE, 2007)	11
FIGURE 2. STRUCTURE DES VAISSEAUX SANGUINS	13
FIGURE 3. EXEMPLES DE L'HETEROGENEITE FONCTIONNELLE DES CELLULES ENDOTHELIALES DANS LA VASCULARISATION HUMAINE ADULTE.....	15
FIGURE 4. MECANISMES DE FORMATION DES VAISSEAUX SANGUINS.....	16
FIGURE 5. CASCADE DE LA COAGULATION	19
FIGURE 6. VOIES D'ACTIVATION DE ENOS DANS LES CELLULES ENDOTHELIALES.....	20
FIGURE 7. MECANISME DE L'EFFET VASODILATATIF DU NO DANS LES CML	21
FIGURE 8. ACTIVATION AU COURS DE LA REPONSE INFLAMMATOIRE AIGUE DE TYPE1 DES CELLULES ENDOTHELIALES	25
FIGURE 9. ACTIVATION AU COURS DE LA REPONSE INFLAMMATOIRE AIGUE DE TYPE2 DES CELLULES ENDOTHELIALES	27
FIGURE 10. CASCADE DES MOLECULES D'ADHERENCE POUR LE RECRUTEMENT LEUCOCYTAIRE PAR LES CELLULES ENDOTHELIALES	27
FIGURE 11. VOIES DE SIGNALISATION RECRUTEES ET ACTIVEES DANS LES CELLULES ENDOTHELIALES EN REPONSE A L'INFLAMMATION CHRONIQUE	30
FIGURE 12. COUPE HISTOLOGIQUE D'ARTERE ARTERIOSCLEROTIQUE CARACTERISTIQUE DE L'AG	31
FIGURE 13. ORIGINE DE CELLULES NEO-INTIMALES DANS DIVERS MODELES D'ETUDE	33
FIGURE 14. DIFFERENCES MAJEURES ET POINTS COMMUNS ANTRE ARTERIOSCLEROSE DU GREFFON ET ATHEROSCLEROSE	35
FIGURE 15. VOIE INTRINSEQUE, EXTRINSEQUE ET DE LA PERFORINE/GRANZYME DE L'APOPTOSE DANS LES CELLULES ENDOTHELIALES	44
FIGURE 16. STRUCTURE-TYPE DES RECEPTEURS NOTCH	47
FIGURE 17. DIFFERENCES STRUCTURALES DES RECEPTEURS ET LIGANDS DE LA VOIE NOTCH	48
FIGURE 18. STRUCTURE DU LIGAND DLK1 (D'APRES SARAH J BRAY ET AL, 2008)	49
FIGURE 19. MECANISMES ET PARTENAIRES DE NICD POUR PERMETTRE L'INDUCTION DE LA TRANSCRIPTION DES GENES-CIBLES DE NOTCH	50
FIGURE 20. ACTIVATION DE LA VOIE DE SIGNALISATION NOTCH.....	51
FIGURE 21. MECANISMES DE CONTROLE DE LA DIFFERENCIATION CELLULAIRE PAR LA VOIE NOTCH.....	56
FIGURE 22. FONCTIONS ONCOGENIQUES DE NOTCH DANS LES CANCERS HEMATOLOGIQUES	57
FIGURE 23. FONCTIONS ONCOGENIQUES DE NOTCH DANS LES TUMEURS SOLIDES	58
FIGURE 24. FONCTIONS ANTI-TUMORALES DE NOTCH DANS LES TUMEURS SOLIDES.....	59
FIGURE 25. VOIE DE SIGNALISATION DU TGF β	60
FIGURE 26. VOIE DE SIGNALISATION NF κ B	61
FIGURE 27. VOIE DE SIGNALISATION DES MAPK.....	61

FIGURE 28. EFFET ANGIOGENIQUE DE DLL4: FORMATION DE NOMBREUSES STRUCTURES VASCULAIRES NON FONCTIONNELLES.....	66
FIGURE 29. MODELE PROPOSE POUR LE MECANISME D'ACTION DU SYSTEME DLL4/NOTCH DANS LE CONTROLE DE L'ANGIOGENESE	67
FIGURE 30. PROFIL TRANSCRIPTIONNEL DE REGULATION DE NOTCH DANS LES CELLULES ENDOTHELIALES EN REPONSE AU TNF.....	79
FIGURE 31.PROFIL PROTEIQUE DE REGULATION DE NOTCH DANS LES CELLULES ENDOTHELIALES EN REPONSE AU TNF.....	80
FIGURE 32. EXPRESSION CONSTITUTIVE ET REGULATION DES GENES EFFECTEURS DE LA VOIE NOTCH HES/HEY AU COURS DE L'ACTIVATION ENDOTHELIALE.....	81
FIGURE 33. ACTIVATION DU RECEPTEUR NOTCH2 DANS LES CELLULES ENDOTHELIALES EN REPONSE AU TNF.....	81
FIGURE 34. REGULATION DE L'ACTIVITE GLOBALE DE NOTCH DEPENDANTE DE CBF1 EN REPONSE AU TNF	82
FIGURE 35. ANALYSE COMPARATIVE DES EFFETS DU TNF SUR NOTCH2, 3, 4 ET DLL1, HES1 ET HEY1 DANS LES CE ET LES CML	84
FIGURE 36.COMPARATIF DES EFFETS DE FACTEURS SOLUBLES SUR LA VOIE DE SIGNALISATION NOTCH.....	85
FIGURE 37. VOIES DE SIGNALISATION IMPLIQUEES DANS LA REGULATION DE NOTCH2, 3, 4 ET DLL1 PAR LE TNF.	87
FIGURE 38. IMPLICATION DE LA VOIE NOTCH DANS LE DEVELOPPEMENT DES CELLULES IMMUNITAIRES	147
FIGURE 39. ROLE DE NOTCH DANS L'ORIENTATION DE LA REPONSE IMMUNITAIRE MEDIEE PAR LES LYMPHOCYTES T	148

Abréviations

AA : acide arachidonique	EMT : Endothelial/epithelial-to-mesenchymal transformation
ADAM : a dysintegrin and metalloproteinase	eNOS : endothelial NO synthase (NOS3)
AG : artériosclérose du greffon	ET1 : endothéline
AGE : advanced glycation end-Products	FADD : FAS-associated death domain
ANG : angiotensines	FGFb : fibroblastic growth factor basic
aPC : Protéine C active	FLIP : FLICE-like inhibitor protein
AP1 : Activator Protein 1	FT : Facteur tissulaire
AR : arthrite rhumatoïde	GDP : guanosine diphosphate
AT : anti-thrombine	GPCR : G protein-coupled receptors
BMP : Bone morphogenic protein	GTP : Guanosine Triphosphate
CADASIL : Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy	HAEC : Human aortic endothelial cells
CD : cellules dendritiques	HEC-GIcNAc6ST : High-endothelial-cell-associated factor N-acetylglucosamine 6-sulphotransferase
CE : cellules endothéliales	NK : Natural Killers
cFLIP : cellular caspase-8 (FLICE)-like inhibitory protein	Hes : Hairy Enhancer of Split
cGMP : cyclic guanosine monophosphate	HEV : high endothelial venules
CML : cellules musculaires lisses	HLA : human leukocyte antigen
CMH : complexe majeur d'histocompatibilité	HLHb : basic helix-loop-helix
CMV : cytomegalovirus	HO1 : Heme oxygenase 1
COX1 : Cyclo-OXygénase 1 ou PGH prostanglandin H synthase I	HUVEC : Human umbilical vein endothelial cells
CPA : cellules présentatrices d'antigènes	ICAM1 : intercellular cell adhesion molecule 1
CRP : protéine C réactive	IFN γ : Interféron- γ
CSL : CBF1, Su(H), Lag1	IL : InterLeukine
DAMP : danger-associated molecular patterns	iNOS : inducible NO synthase (NOS2)
DSL : Delta and Serrate ligands	InsP3 : inositol-1,4,5-triphosphatePtdIns(4,5)P2 phosphatidylinositol-4,5-biphosphate
EDCF : Endothelium-derived contracting factor	IRAK : IL1R-associated kinase
EDRF : Endothelium-derived relaxing factors	IS : Immunosupresseurs
EPCR : récepteur de la protéine C	JIP1 : JNK-interacting protein 1
EDHF : endothelium-derived hyperpolarizing Factor	JNK : c-Jun N-terminal kinase
EGF : Epidermal Growth Factor	LB : lymphocytes B
	LDL : low density lipoprotein

LFA1 : Lymphocyte function-associated antigen
 LNR : LIN12/NOTCH repeats
 LPS : lipopolysaccharide
 LT : lymphocytes T
 LT β : lymphotoxine β
 MAPK : Mitogen-activated protein kinase
 MEC : matrice extra-cellulaire
 MLCK : myosin light chain kinase
 MLCP : myosin light chain phosphatase
 MyD88 : myeloid differentiation primary-response gene 88
 NA : noradrénaline
 NCR : Notch Cytokine Response region
 NECD : Notch Extra-Cellular domain
 NF κ B : Nuclear Factor- κ B
 NICD : Notch Intra-Cellular Domain
 NLS : Nuclear Localization Signal
 NO : monoxyde d'azote
 NOS : NO synthase
 NRR : negative regulatory region
 NSF : normal synovial fibroblasts
 NTM : Notch transmembraneous Domain
 OLT : organes lymphoïdes tertiaires
 PAMP : pathogen-associated molecular patterns
 PAF : platelet-activating factor
 PC : pericytes
 PDGF : Platelet derived growth factor
 PECAM1 platelet-endothelial cell adhesion molecule 1, CD31
 PAEC : Porcine endothelial cells
 PAI-1 : plasminogen activator inhibitor-1
 PGI : prostaglandines
 PGI2 : prostacycline
 PI3K : phosphatidylinositol 3-kinase
 PKG : protéine kinase G
 PLC A2 : phospholipase C A2
 PLC β : phospholipase C β
 PRR : pathogens recognition receptors
 PS : phosphatidylsérines
 PSGL1 : P-selectin glycoprotein ligand-1
 RAGE : AGE Receptor
 Rho : Ras homolog
 Rho-GEF : Rho Guanine-nucleotide exchange factor
 RING : Really interesting new gene
 RIP1 : Receptor Interacting Protein
 ROCK : Rho-dependant kinase
 ROS : reactive oxygen species
 RSF : rheumatoid *synovial* fibroblasts
 SMRT : silencing mediator of retinoid and thyroid hormones
 TAD : trans-activation domain
 TAN1 : Translocation-associated Notch1
 TAF1 : thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor
 TCR : T cell receptor
 TFPI : inhibiteur du facteur tissulaire
 TGF β : transforming growth factor beta
 TIRAP : Toll/IL1 Receptor Accessory Protein
 TLR : Toll-like Receptor
 TM : thrombomoduline
 TNF : Tumor Necrosis Factor
 TNF-R : TNF receptor
 tPA : tissu plasminogen activator
 TRADD : TNFR-Associated via Death Domain
 TRAF : TNFR-Associated Factor
 TXA2 : thromboxane A2
 uPA : urokinase plasminogen activator

Introduction

La Transplantation

La transplantation se définit comme le transfert de cellules, de tissus ou d'organes d'un individu (donneur) à un autre individu (receveur). Chez l'Homme, la plupart des transplantations sont des greffes d'organes entre deux individus génétiquement différents. On parle alors d'allotransplantation.

I. Historique

Le concept de la transplantation d'organes chez l'Homme est très ancien. On raconte que dès le III^{ème} siècle, une greffe de jambe aurait été tentée par Saint Côme et Saint Damien sur un homme qu'ils venaient d'amputer. Ce n'est toutefois que depuis la seconde moitié du XX^{ème} siècle que la transplantation s'est révélée être une alternative thérapeutique de choix quand les traitements « classiques » pharmacologiques ne permettent pas de sauver la fonction d'un organe.

La première allogreffe rénale est réalisée en 1933 par Serguey Voronoy en Russie, qui greffe le rein d'un homme décédé au niveau de l'aîne d'une jeune malade de 26 ans. Quatre jours après la greffe, la patiente décède. Les expérimentations et les essais chez l'Homme reprennent après un temps d'arrêt pendant la seconde guerre mondiale, principalement sur la greffe de rein notamment à Paris et à Boston, les deux capitales de la transplantation à l'époque. Au fil des années, la technique s'améliore, aussi bien au niveau de la préparation de l'organe que de l'acte chirurgical lui-même, permettant jusqu'à plusieurs mois de survie. Toutefois, toutes les tentatives se heurtent à l'obstacle majeur de cette thérapeutique, le rejet. C'est grâce aux premiers résultats sur le système HLA de Jean Dausset que la première greffe rénale avec une survie excédant 6 mois est réalisée en 1954 à Boston entre deux vrais jumeaux, démontrant ainsi l'origine immunologique du rejet de greffe (Merrill J.P. 1956). Quelques années plus tard suivront les transplantations de foie en 1967 (Starzl T.E. 1968), puis de cœur en 1968 (Barnard C.N. 1968). Malgré ces avancées, jusqu'aux années quatre-vingt, l'activité de greffe est essentiellement consacrée au rein. Malgré les progrès réguliers de la chirurgie et de la prise en charge des patients, la fréquence des rejets reste mal jugulée par les corticoïdes et limite le recours à cette thérapeutique.

L'arrivée de la ciclosporine, découverte dans les années soixante-dix et utilisée à partir de 1982 marque un tournant dans l'histoire de l'immunosuppression et de la Transplantation. Cette nouvelle génération de médicament anti-rejet permet de prolonger nettement la survie des greffons et des patients transplantés.

II. Problématiques et Enjeux

Aujourd'hui, les problématiques ont évolué. En France, la « démocratisation » de cette technique médicale qui a vu son nombre passer de 666 en 1980, à 949 en 1990 puis à 4666 en 2007, met en exergue le manque croissant de greffons disponibles pour palier aux nombreuses demandes. En 2007, sur plus de 17000 personnes inscrites sur la liste d'attente d'un organe, seules 4666 ont été transplantées (Agence de la biomédecine, 2007). C'est principalement la compréhension des mécanismes de rejet qui a permis de faire des avancées remarquables dans la prise en charge des patients, expliquant ainsi le développement de cette stratégie thérapeutique. Il existe à ce jour 3 types de rejets qui résultent de la reconnaissance des allo-antigènes du greffon par le système immunitaire du receveur.

Le rejet hyper aigu d'une part, intervient dans les premières heures suivant la greffe. Il est du à la présence chez le receveur d'anticorps préformés contre les antigènes de groupes sanguins (Kourilsky P. 1987) et/ou des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) du donneur (Williams G.M. 1968). Ces anticorps sont produits à la suite de pré-sensibilisations (transfusions sanguines, grossesse, transplantations antérieures) et provoquent la thrombose, la nécrose et la perte rapide du greffon. Ce type de rejet est aujourd'hui prévenu par la recherche systématique de ces anticorps (test cross-match).

Le rejet aigu intervient quant à lui dès la première semaine après la greffe. Il est du à une activation du système immunitaire à médiation cellulaire et humorale du receveur, en particulier des lymphocytes T spécifiques d'antigènes portés par le greffon. Ce rejet est relativement bien contrôlé de nos jours, avec des taux de survie respectifs des greffons rénaux et cardiaques de 92% et 94% 1 an après la transplantation grâce à l'emploi systématique de traitements immunosuppresseurs (IS) (Agence de la biomédecine, 2007).

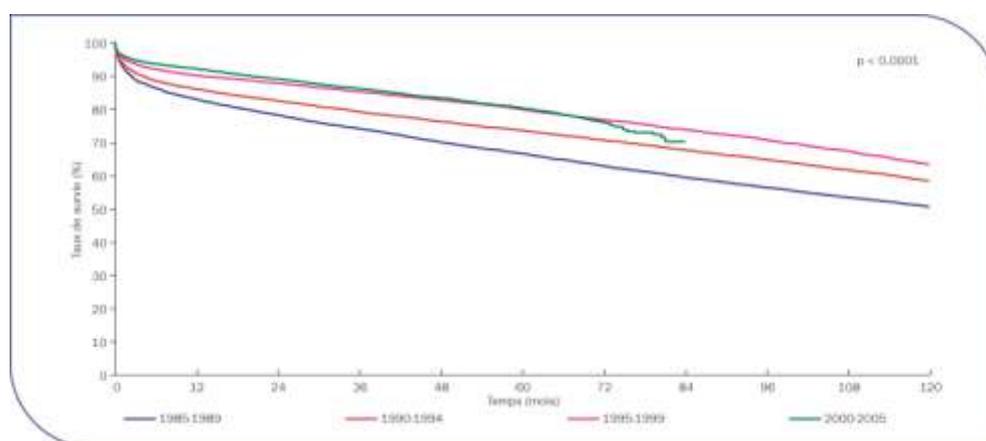


Figure 1. Courbe de Survie des greffons rénaux depuis 1985 (Agence de la Biomédecine, 2007)

Enfin, la perte du greffon à long terme reste mal caractérisée. Ce rejet chronique, ou dysfonction chronique du greffon, est multifactoriel, ses origines incluant aussi bien des composantes immunologiques que non-immunologiques. L'artériosclérose du greffon (AG) qui le caractérise dans le cœur et le rein notamment, est définie par l'occlusion progressive de la lumière des vaisseaux sanguins du greffon par une prolifération des cellules musculaires lisses dans la néointima. Malgré les progrès des techniques chirurgicales et la mise au point de nouveaux IS, la survenue du rejet chronique n'est ni contrôlée ni même prévenue. La compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires à l'origine de cette dysfonction est donc un des enjeux majeurs actuels de la Transplantation.

En transplantation, l'endothélium du greffon est l'interface physique entre le donneur et le receveur. En plus de cette place stratégique, l'endothélium est une composante commune à tous les facteurs impliqués dans l'initiation et la progression de l'AG. Ce compartiment cellulaire est donc un modèle de choix pour identifier et prévenir les mécanismes délétères à l'origine de cette pathologie.

L'Endothélium

I. Définition

L'endothélium est une mono-couche cellulaire située à un endroit stratégique entre le sang et les tissus. Cette mono-couche, constituée de cellules endothéliales (CE), borde l'intérieur des vaisseaux sanguins. Ces CE sont polarisées : la face apicale est en contact avec la lumière du vaisseau, la face basale quant à elle, repose sur une membrane basale et sur une fine couche de tissu conjonctif fibro-élastique. Cet ensemble constitue la tunique interne des vaisseaux sanguins, aussi appelé intima ou *tunica intima* (Stary H.C. 1992).

La paroi des vaisseaux sanguins est constituée de 2 autres couches : la média et l'adventice. L'intima est séparée de la couche sous-jacente de la média (ou *tunica média*) par la limitante élastique interne composée de fibres d'élastine et de fibrilline. La média est quant à elle constituée principalement de cellules musculaires lisses vasculaires (CML) empilées de façon concentrique avec plus ou moins de fibres élastiques et de collagène en fonction des vaisseaux. L'adventice (ou *tunica adventitia*) séparée de la média par une autre limitante élastique (externe) est formée d'un tissu conjonctif peu organisé, riche en collagène et en fibres élastiques, et contenant des fibroblastes et des adipocytes. Pour les vaisseaux artériels de gros calibres, l'adventice est irriguée par de *vasa vasorum*, micro-vaisseaux qui ont un rôle nourricier pour l'adventice elle-même et pour la partie externe de la média (Figure 2).

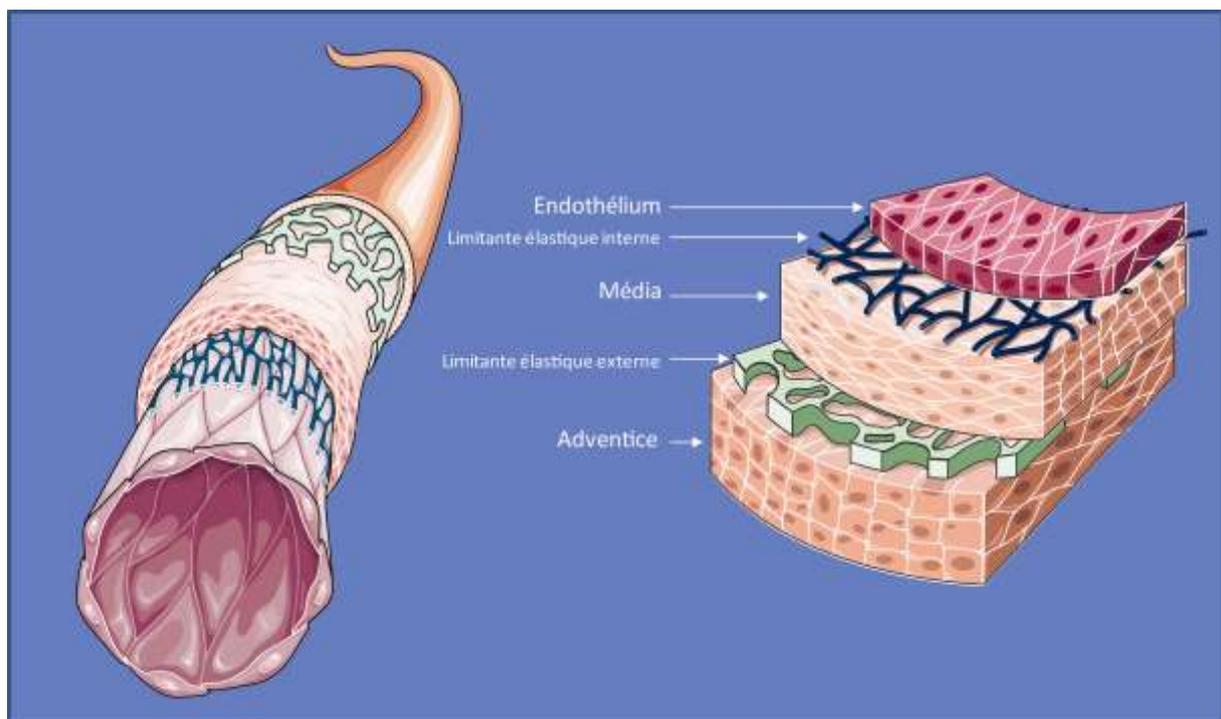


Figure 2. Structure des vaisseaux sanguins (Servier Medical Art)

L'endothélium a longtemps été considéré comme une surface inerte bordant la paroi des vaisseaux avec comme fonction principale de maintenir la perméabilité vasculaire. Au XVII^{ème} siècle, Malphigi est le premier à décrire le réseau de vaisseaux et la barrière physique séparant le sang des tissus. Au XIX^{ème} siècle, Von Reckinghausen identifie les CE comme la barrière cellulaire bordant l'intérieur des vaisseaux sanguins. Il faudra attendre le développement technologique de la microscopie électronique dans les années 50 pour que Palade et Gowan puissent observer des interactions entre les leucocytes circulants et l'endothélium (Weiber A. 1964). Depuis, de très nombreuses études ont pu montrer à quel point l'endothélium est une surface dynamique et hétérogène. Il constitue un organe vaste contrôlant des fonctions clé de l'hémodynamisme et de l'inflammation.

En terme de développement, les CE dérivent du mésoderme par la différenciation d'hémangioblastes et/ou d'angioblastes (Augustin H.G. 1994; Coultas L. 2005). Toutefois, d'autres lignages cellulaires peuvent se transdifférencier en CE tout comme les CE en d'autres lignages (Planat-Benard V. 2004; Wurmser A.E. 2004). Les CE sont physiologiquement « quiescentes », dans le sens où elles ne prolifèrent pas activement. Elles gardent néanmoins une grande capacité de prolifération que l'on retrouve dans certaines conditions physiologiques (périodes ovulatoires) et pathologiques (néo-angiogenèse tumorale).

Le corps humain adulte comporte environ $1 \text{ à } 6.10^{13}$ CE (Augustin H.G. 1994), recouvrant une surface de $1 \text{ à } 7 \text{ m}^2$ et avec un poids d'environ 1 kg. Les CE bordent la face luminale des vaisseaux sanguins et régulent finement le flux de substances nutritives, de métabolites et de nombreuses molécules biologiquement actives. De plus, elles sont également perméables à certaines cellules circulantes, tels que les leucocytes, afin de leur permettre de migrer dans les tissus sous-jacents, notamment dans le cadre d'une réaction inflammatoire. De par sa position stratégique d'interface entre le sang et les tissus, l'endothélium joue le rôle de senseur et de relais de nombreux facteurs circulants dans le sang (facteurs de croissance, facteurs de coagulation, particules lipidiques, métabolites (monoxyde d'azote (NO), sérotonine (5HT)), hormones...). Ces nombreux signaux sont intégrés par les CE pour réguler leurs fonctions propres (perméabilité, hémostasie, apoptose, prolifération, molécules d'adhérence...) mais également la fonction plus globale du vaisseau (vasomotricité, remodelage vasculaire).

II. Hétérogénéité

Il existe au sein des CE une grande hétérogénéité, à la fois au niveau structural et fonctionnel le long de l'arbre vasculaire. L'épaisseur des CE varie de $0.1 \mu\text{m}$ dans les capillaires à $1 \mu\text{m}$ dans l'aorte (Florey 1966). De plus, l'étirement des CE est fonction des forces de cisaillements dues au flux sanguin et diffère entre les artères de gros calibre où le flux est important aux capillaires ou aux

veinules où les forces mécaniques du flux sanguin sont moindres. Chez le rat par exemple, les CE aortiques sont longues et fines (55x10 µm) ; les CE de l'artère pulmonaire sont plus larges et courtes (30x14 µm) avec une forme rectangulaire ; les CE de la veine cave inférieure sont plus larges et rondes.

L'endothélium peut être continu (majorité des vaisseaux artériels et veineux) ou discontinu (ex. sinusoides hépatiques). L'endothélium continu peut être fenestré (ex. capillaires glandes exo- et endocrines) ou non. Ces particularités de structure au niveau des jonctions inter-CE traduisent des perméabilités variables aux substances circulantes et aux cellules et donc des orientations fonctionnelles particulières en fonction de la localisation dans l'organisme (pour revue, (Bazzoni G. 2004; Aird W.C. 2007).

L'hétérogénéité des CE ne s'arrête pas aux différences morphologiques. D'importantes différences au niveau sub-cellulaire sont aussi observées, notamment par la présence ou l'absence de corps de Weibel-palade (qui renferment le facteur de von Willebrand ou la P-sélectine) et de VVO (vesiculo-vacuolar organelle impliquée dans la perméabilité endothéliale) (Dvorak A.M. 2001; Feng D. 2002).

Fonction	Site Primaire	Mécanisme	Commentaires
Permeabilité Basale	Capillaires	Espaces inter-cellulaires, vésicules de transcytose, canaux transendothéliaux	Intervient en continu à travers l'endothélium mais à des rythmes variables selon l'origine vasculaire
Inductible	Veinules postcapillaires	Espaces inter-cellulaires, vésicules de transcytose, canaux transendothéliaux	Peut être physiologique (localisé, transitoire) ou pathologique (systémique, maintenue ou/et excessive)
Transmigration leucocytaire	Veinules postcapillaires de la peau, mesentère, muscle; capillaires des poumons et du foie; HEV des ganglions lymphatiques	Répertoire local spécifique de sélectines, chimiokines et de ligands d'intégrines	Mécanismes dépendants du site et des sous-populations leucocytaires
Hémostase	Panvasculaire	Libération locale spécifique de molécules pro- et anti-coagulantes	
Vasomotricité	Artéριοles	Libération locale spécifique de molécules vaso-actives	
Humidification	Microcirculation Bronchiolaire	Surface de contact importante et proximité des voies aériennes	
Thermorégulation	Microcirculation Bronchiolaire et cutanée	Surface de contact importante, proximité des voies aériennes et de l'environnement externe (peau)	Vasoconstriction des vaisseaux cutanés conserve la chaleur corporelle ; la vasodilatation et l'augmentation du flux sanguin secondaire au niveau de la peau induit le transfert de chaleur par convection de l'intérieur vers la périphérie du corps.
Tolérance immunitaire	Sinusoides hépatiques	MHC class I and II molecules, costimulator molecules	Tolérance orale
Prolifération/ angiogenèse	Organes reproducteurs	Changements cycliques dans l'expression des facteurs de croissance	

Figure 3. Exemples de l'hétérogénéité fonctionnelle des Cellules Endothéliales dans la vascularisation humaine adulte (D'après William C. Aird *et al*, 2007)

Enfin, au niveau moléculaire, de nombreuses molécules et protéines peuvent être préférentiellement exprimées dans un type de CE donné (ex. NO, E- et P-sélectine, VCAM1...).

Ainsi, l'ensemble de ces disparités permettent d'orienter les fonctions des CE (Figure 3). Toutefois, toutes les CE possèdent des fonctions communes de contrôle du tonus vasculaire, de l'hémostase, du remodelage vasculaire et de l'inflammation.

III. Fonctions générales

1. Formation et Remodelage Vasculaire

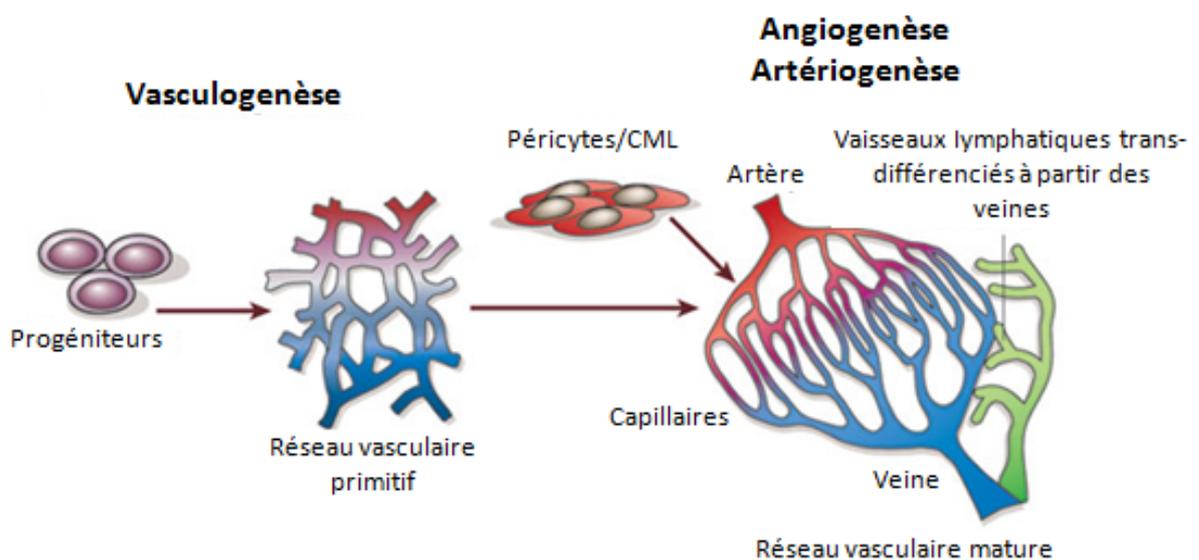


Figure 4. Mécanismes de formation des vaisseaux sanguins

Les CE régulent la formation des vaisseaux sanguins. Différents mécanismes sont responsables de ce processus. La vasculogénèse tout d'abord, consiste en la différenciation de progéniteurs (hémangioblastes et angioblastes) issus de la moelle osseuse en réseau vasculaire primitif par agrégation des CE dérivées de leur différenciation. L'angiogenèse et l'artériogenèse sont deux mécanismes de formation vasculaire à partir de vaisseaux préexistants (Jain R.K. 2003).

Au cours de la vasculogénèse chez l'embryon, la différenciation des angioblastes en CE et la formation des structures vasculaires primitives induit le recrutement d'autres types cellulaires tels que les cellules musculaires lisses (CML) vasculaires ou les péricytes (cellules musculaires associées aux vaisseaux de petit calibre) (Semenza G.L. 2007). Ces événements sont régulés par la libération de facteurs dont un des principaux est le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) (Bhisitkul R.B. 2006). Le VEGF existe sous plusieurs isoformes (VEGFa, b,...) et il est associé à deux récepteurs

exprimés essentiellement par les CE, VEGF R1 (Flt1) et VEGF R2 (Flk1). En combinaison avec le FGFb (fibroblastic growth factor), il permet la différenciation des angioblastes en CE. Cette différenciation est également dépendante des intégrines et de la matrice extracellulaire (MEC).

L'angiogenèse est initiée par une vasodilatation des vaisseaux induite par le VEGF et médiée par le NO. Le relâchement des contacts intercellulaires et le détachement des CML et de la MEC est induit par l'interaction de l'angiopoïétine 1 et 2 sur leurs récepteurs Tie1 et Tie2. Les CE prolifèrent ensuite et migrent sous l'influence du VEGF et de l'angiopoïétine-1 pour enfin former la lumière du vaisseau. Au cours de ce processus, le PDGF (Platelet derived growth factor) et le TGF β (transforming growth factor beta) interviennent pour stabiliser la structure néoformée (Madri J.A. 1988; Jain R.K. 2003).

Tout comme la vasculogenèse, le processus d'angiogenèse se passe au cours du développement embryonnaire. On le retrouve également chez l'adulte, notamment dans le cadre pathologique de la néo-angiogenèse tumorale. De plus, chez l'adulte, les CE sont à l'origine de l'initiation et de la progression de remodelage vasculaire. Ainsi, dans certaines situations pathologiques telles qu'une lésion tissulaire, une hypoxie, un cancer ou une condition inflammatoire chronique, des mécanismes de remodelage vasculaire se mettent en place pour compenser les altérations induites. Par exemple, en réponse à une hypoxie chronique (modèle expérimental de l'hypertension artérielle pulmonaire), les CE vont libérer des facteurs qui vont promouvoir la prolifération des CML afin de développer une force de contraction plus importante des vaisseaux et ainsi de maintenir un taux d'oxygénation normal pour l'organisme. De même, en réponse à une lésion intimale, des mécanismes de réparation sont mis en place et particulièrement par les CE sous le contrôle notamment du FGF et du VEGF (Asahara T. 1995). Enfin, dans le cadre de pathologies inflammatoires chroniques telles que l'arthrite rhumatoïde et l'athérosclérose, les cellules et les facteurs de l'inflammation et de l'immunité vont moduler l'homéostasie endothéliale (activation chronique, apoptose) qui vont alors favoriser le développement de remodelage de la paroi vasculaire. Toutefois, les mécanismes précis mis en jeu dans ces contextes restent à être caractérisés.

2. Hémostase

Le système de l'hémostase permet de maintenir la fluidité du sang et dans le cas d'une lésion vasculaire, de bloquer l'irrigation sanguine en formant un caillot (thrombus). La coagulation, ou thrombose, permet ainsi de limiter l'écoulement sanguin. Ce processus d'urgence et vital est en partie contrôlé par les CE mais fait également intervenir les plaquettes et les protéines plasmatiques. Les interactions coordonnées de ces acteurs permettent la formation du caillot dès qu'une brèche apparaît dans le système vasculaire. Une fois la brèche colmatée, le caillot est fragilisé et digéré par la réaction de fibrinolyse.

a) La coagulation

Une des fonctions cruciales de l'endothélium est de faciliter le flux sanguin en présentant dans la lumière des vaisseaux une surface anti-thrombotique inhibant l'adhésion des cellules sanguines et l'agrégation plaquettaire.

Cette fonction de l'endothélium au repos est rendu possible par l'expression de molécules anticoagulantes telles que TFPI (inhibiteur du facteur tissulaire), l'anti-thrombine (AT), la thrombomoduline (TM), l'EPCR (récepteur de la protéine C), les héparanes sulfates et les glyaminoglycans. La plupart de ces protéines ont un rôle anti-thrombotique en séquestrant ou en bloquant les initiateurs et les activateurs de la cascade de coagulation (pour revue (Bombeli T. 1997)).

Parmi les principaux activateurs de la coagulation, la thrombine est une sérine protéase qui joue plusieurs fonctions clés dont l'activation des plaquettes, d'enzymes et de cofacteurs de la cascade de coagulation. En condition de repos, la thrombine est séquestrée par la TM, facilitant l'activation anticoagulante de la protéine C (aPC) (Fukudome K. 1996). Cette activation est de plus favorisée par la protéine S, synthétisée également par les CE. Enfin, la liaison TM-Thrombine diminue l'activité des enzymes envers les plaquettes, les facteurs V, XIII et le fibrinogène, tout en augmentant l'activité fibrinolytique des CE. A l'inverse, au cours de l'activation endothéliale (cf partie activation endothéliale), l'endothélium acquiert un phénotype pro-coagulant en sur-exprimant notamment les phosphatidylsérines, capables d'initier ou d'amplifier la cascade de coagulation.

b) La fibrinolyse

Le caillot plaquettaire formé par la cascade de la coagulation est consolidé par la production de fibrine. La réaction de fibrinolyse permet donc la dissociation de ce complexe et du caillot lui-même par la transformation du plasminogène en plasmine. C'est la plasmine qui est responsable du blocage de la formation de fibrine et de la fragilisation de l'agrégat.

La fonction de l'endothélium dans ce processus diffère selon que l'endothélium est quiescent ou activé (cf partie activation endothéliale). Elle dépend également de la localisation des CE dans le réseau vasculaire et de la concentration des autres molécules de l'hémostase dans le milieu (pour revue (Cesarman-Maus G. 2005)). La réaction de conversion du plasminogène (zymogène plasmatique) en plasmine est assurée par le tissu plasminogen activator (tPA) et l'urokinase plasminogen activator (uPA). Une fois initiée, cette réaction est amplifiée par un mécanisme de retro-contrôle positif, la plasmine clivant le tPA comme le uPA en 2 chaînes polypeptidiques plus actives. Seules les CE de la microvascularisation sécrètent le tPA dont l'expression est régulée par de nombreux stimuli (ex. thrombine, histamine, bradykinine, Adrénaline, occlusion veineuse, flux sanguin). Le tPA assure la production de la plasmine à proximité de la fibrine mais son activité est inhibée par l'inhibiteur PAI-1

(plasminogen activator inhibitor-1). La sécrétion de cet inhibiteur est stimulée notamment par des cytokines, des facteurs de croissance et des lipoprotéines impliquées dans la réponse inflammatoire.

De plus, une fois produite, la fibrinolyse par la plasmine est inhibée par l'antiplasmine α_2 . Toutefois, si la plasmine est générée au contact de la fibrine, cette inhibition n'est plus effective, assurant ainsi la spécificité et de la dissolution du caillot. L'autre activateur, l'uPA, est exprimé non seulement par les CE mais également par les monocytes/macrophages. Il est moins affiné pour la fibrine que le tPA mais reste efficace dans sa fonction de conversion du plasminogène en plasmine. Il est également impliqué dans les mécanismes d'angiogenèse et dans la réparation de lésions vasculaires.

Comme décrit précédemment, la thrombine est une molécule clé pro-coagulante et séquestrée par la TM à la surface des CE. De plus, le complexe TM/thrombine favorise la capacité de la TM à activer la protéine *thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor* (TAFI). TAFI activée diminue la génération de plasmine, stabilisant le thrombus et ralentissant la fibrinolyse. En régulant l'expression de la TM, les

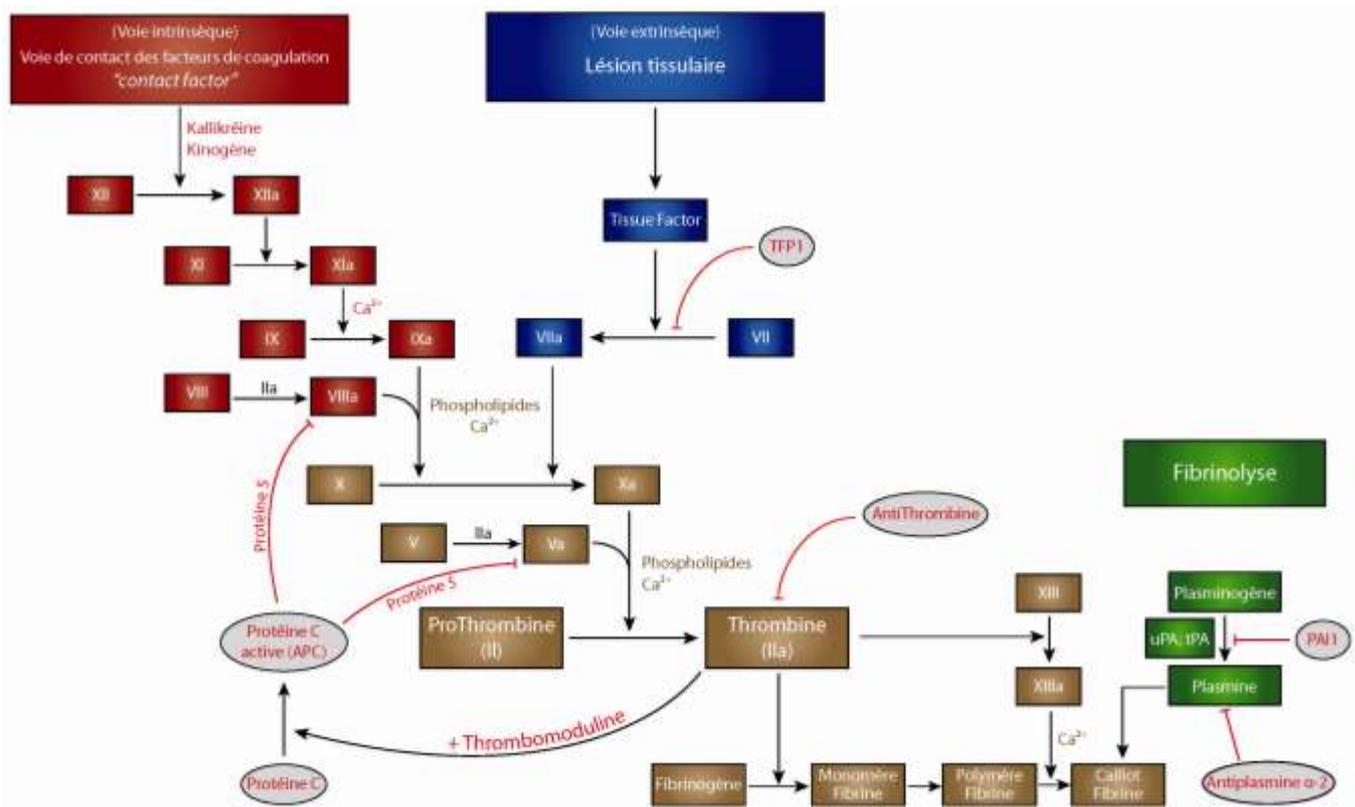


Figure 5. Cascade de la coagulation

Facteurs de la cascade de coagulation :

I : Fibrinogène ; II : Prothrombine ; III : Thromboplastine tissulaire ou Facteur Tissulaire ; V : Pro-accélélerine ; VII : Pro-convertine ; VIII : Facteur antihémophilique A ; IX : Facteur Christmas ou Antihémophilique B ; X : facteur Stuart ; XI : PTA «Plasma Thromboplastin Antecedent» ; XII : facteur Hageman ; XIII : facteur stabilisant de la fibrine

CE contrôlent donc en partie ce processus de fibrinolyse.

3. Tonus vasculaire

Le flux sanguin est contrôlé au niveau vasculaire par la régulation du diamètre de la lumière du vaisseau. Cette régulation est opérée par le degré de contraction des cellules musculaires lisses de la média. L'endothélium régule finement la contraction et la dilatation vasculaire en sécrétant des substances contractantes (EDCF, *Endothelium-derived contracting factor*) et/ou relaxantes (EDRF, *Endothelium-derived relaxing factors*).

Les CE captent dans le sang et transmettent les substances vasoactives telles que la noradrénaline (NA), les prostaglandines (PGI), les angiotensines (ANG), l'endothéline (ET1) et la sérotonine (5HT) libérée par les plaquettes dans la circulation. La libération de ces facteurs est également dépendante des forces mécaniques de cisaillement exercées par le flux sanguin sur l'endothélium. Par exemple, plus le débit de perfusion d'une artère isolée augmente et plus la libération de facteurs relaxants par les CE est importante. Cette mécanique permet ainsi de maintenir un flux sanguin constant (flux qui dépend de la vitesse de perfusion et du diamètre des vaisseaux). La relaxation des vaisseaux est également sous le contrôle de molécules solubles qui interagissent avec leur récepteur couplé aux protéines G trimériques à la surface des CE pour induire la synthèse de NO. Le NO est une des molécules les plus importantes dans la vasodilatation, et plus particulièrement dans les vaisseaux de gros calibres (Palmer R.M. 1987). Sa synthèse à partir de la L-arginine est réalisée par l'enzyme NO synthase (NOS) qui existe sous 2 formes dans les CE : eNOS (ou NOS3) exprimée de manière constitutive et iNOS (ou NOS2), inductible, notamment dans le cadre de réactions inflammatoires. eNOS est exprimée de manière constitutive dans les CE et elle est principalement régulée par la concentration calcique intra-cellulaire via le complexe Ca^{2+} /calmoduline (Figure 6).

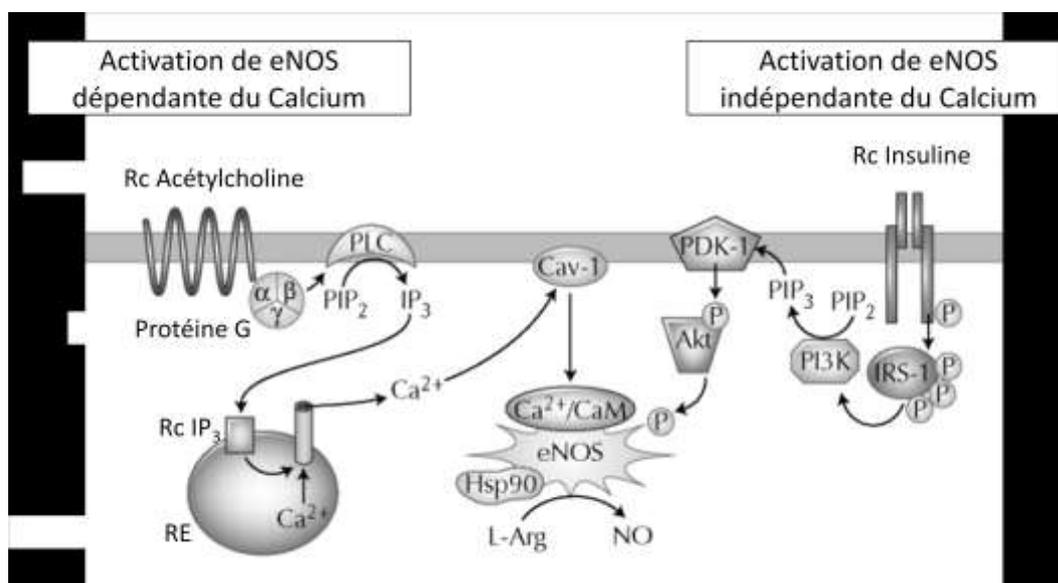


Figure 6. Voies d'activation de eNOS dans les Cellules Endothéliales

Le NO est un excellent messager intracellulaire de par sa facilité à diffuser à travers la plupart des cellules et tissus. Au niveau des cellules musculaires lisses, le NO se lie à la guanylate cyclase intracytoplasmique qui produit alors de grandes quantités de cyclic guanosine monophosphate (cGMP). Le cGMP active la protéine kinase G (PKG) qui entraîne une diminution de la concentration intracellulaire en calcium et induit une vasorelaxation (Figure 7).

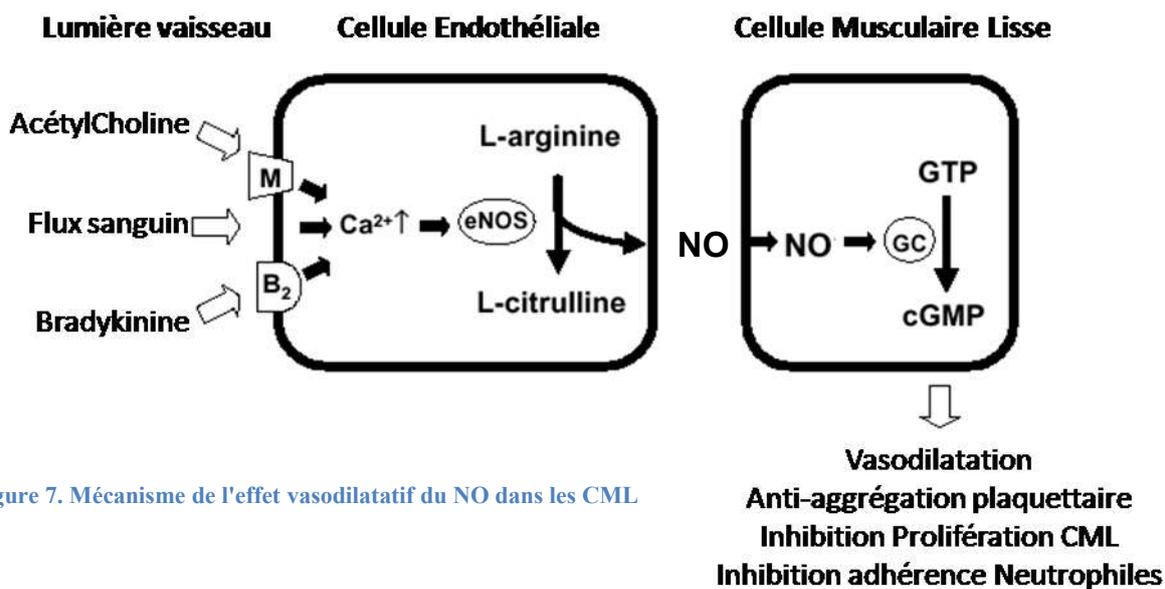


Figure 7. Mécanisme de l'effet vasodilatateur du NO dans les CML

Dans la circulation sanguine, la demi-vie du NO est très courte, soit environ 4 secondes mais sa libération locale par les CE a également un rôle sur les cellules dans la lumière du vaisseau en inhibant l'adhésion et l'activation des leucocytes et des plaquettes.

Les molécules circulantes qui stimulent la production de NO par les CE sont soit (1) des hormones (ex. catécholamines, vasopressine), (2) des autacoïdes (facteurs circulants dans le sang) comme la bradykinine, l'endothéline (ET-3) ou l'histamine, (3) des médiateurs libérés par les plaquettes (ex. sérotonine, Adénosine diphosphate) ou formés lors de la coagulation (thrombine) (pour revue (Gewaltig M.T. 2002)).

En plus des EDRF, l'EDHF (endothelium-derived hyperpolarizing Factor) est également libéré par l'endothélium pour permettre la dilatation des vaisseaux (Feletou M. 2006). La nature biochimique de ce facteur reste cependant controversé et plusieurs EDHF ont été proposés : métabolites de l'acide arachidonique (AA) dérivés du cytochrome P450 (*p450-derived epoxyeicosatrienoic acid* ou EET), l'anandamine, le peroxyde d'hydrogène, le peptide natriurétique de type C, les ions potassium (Busse R. 2002; Griffith T.M. 2004).

A l'inverse des EDRF et EDHF, les cellules endothéliales peuvent également libérer des substances EDCF afin de provoquer la contraction des cellules musculaires lisses de la média. Les principaux EDCF sont l'endothéline (ET1, ET2), les prostanoïdes vasoconstricteurs tels que le thromboxane A2 (TXA2) et la prostaglandine H2, les anions superoxydes et les composants du système rénine-angiotensine. Ces EDCF interagissent au niveau des CML sur leur récepteur à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G pour activer la libération de calcium dans le cytoplasme et l'activation des petites protéines G de la famille Rho (Loirand G. 2006). Ces 2 voies d'activation conduisent à la phosphorylation de la chaîne légère de la myosine initiatrice de la contraction cellulaire.

4. Inflammation

L'ensemble du processus de l'activation endothéliale et son rôle dans l'initiation et le développement de la réponse inflammatoire sera développée dans le chapitre suivant.

IV. L'Activation Endothéliale au cours de l'inflammation

1. Le Processus inflammatoire

L'inflammation est un processus qui se met en place rapidement après une infection microbienne ou une lésion tissulaire. Elle est initiée par la reconnaissance des *pathogen-associated molecular patterns* (PAMP) présentés à la surface des pathogènes par les *pathogens recognition receptors* (PRR) incluant les récepteurs *Toll-like* (TLR), et par les *danger-associated molecular patterns* (DAMP) lors de réactions inflammatoires non infectieuses. Les premières cellules effectrices sont les neutrophiles (50 à 70% des leucocytes) et les macrophages (3 à 8% des leucocytes) qui permettent l'éradication des agents infectieux et l'élimination des débris cellulaires. Si ce processus est suffisamment efficace, l'inflammation aiguë se résorbe et le tissu inflammé retrouve son architecture initiale. Toutefois, si cette première vague de l'immunité innée ne réussit pas à définitivement éliminer la source de l'inflammation, l'immunité adaptative se met en place. Cette deuxième vague se caractérise par le recrutement des leucocytes qui sont attirés sur le site inflammatoire pour éliminer de façon antigène-spécifique la source infectieuse. Dans le cadre de la transplantation, cette réaction immunitaire dirigée contre le greffon (reconnu alors comme un corps étranger) aboutit au rejet aigu et contribue au rejet chronique si elle n'est pas contrôlée par les IS. Cette seconde vague suffit généralement pour éliminer le stimulus qui a résisté à l'immunité innée, et conduit à la résolution de l'inflammation.

Là encore, si la source n'est toujours pas éliminée (microbes résistants, auto-antigènes dérivés des tissus, greffon), une inflammation chronique se met en place avec la formation de néo-tissus

(remodelage vasculaire, *pannus* dans l'arthrite rhumatoïde) et de structures lymphoïdes organisées ectopiques (ou tertiaires).

L'inflammation est donc une réponse physiologique pour permettre l'élimination d'un signal de danger. Quand elle n'est pas contrôlée, elle donne lieu, à terme, à de profondes modifications des structures des tissus. Dans de nombreux cas, ce sont ces perturbations architecturales qui sont à l'origine des pathologies issues d'une réaction inflammatoire chronique. Afin de prévenir le développement de telles pathologies, il est donc essentiel d'identifier précisément les acteurs et les mécanismes mis en jeu durant l'inflammation. En particulier, un des éléments centraux de ce processus, de par sa position et ses fonctions, est l'activation endothéliale.

2. L'Inflammation aiguë

L'inflammation aiguë a pour objectif de recruter rapidement (en quelques heures) les neutrophiles circulants dans le sang. Ce recrutement fait intervenir l'activation endothéliale. L'activation endothéliale est un ensemble de modifications phénotypiques et fonctionnelles des CE qui acquièrent ainsi de nouvelles fonctionnalités. Elle se caractérise par 2 phases : L'activation de type I tout d'abord, aussi appelée stimulation, est indépendante de l'expression de gènes. L'activation de type II est une réponse plus tardive car fait intervenir la synthèse de protéines *de novo*.

L'activation endothéliale participe aux 3 premiers des « 4 points cardinaux » de l'inflammation : (1) la modulation du flux sanguin par vasoconstriction puis vasodilatation locale, traduite par la rougeur et la chaleur dégagée au niveau des tissus inflammés ; (2) l'augmentation de la perméabilité vasculaire de la zone infectée ou lésée, avec fuite de l'exsudat (fluide aqueux riche en protéines dans le tissu interstitiel qui provoque le gonflement d'un tissu inflammé ; (3) le recrutement et l'activation de leucocytes de telle manière qu'ils puissent intégrer les tissus infectés ou lésés ; (4) La douleur, le quatrième point cardinal, est causée par la libération de médiateurs solubles par les leucocytes sur les fibres nerveuses de type C.

a) Type I

L'activation endothéliale de type I est induite principalement par des ligands de récepteurs couplés aux protéines G trimériques (GPCR) comme le récepteur à l'histamine H1, couplé à la protéine G composée de la sous-unité α_q (Pober J.S. 1990). L'activation de ce récepteur induit l'échange du GDP associé à α_q en GTP qui permet la libération de α_q du dimère $\beta\gamma$. α_q -GTP active alors l'isoforme β de la phospholipase C β (PLC β) qui catalyse le relargage cytoplasmique de l'inositol-1,4,5-triphosphate (InsP $_3$) à partir du phosphatidylinositol-4,5-biphosphate (PtdIns(4,5)P $_2$) membranaire. L'InsP $_3$ induit alors l'élévation transitoire de la concentration calcique ($[Ca^{++}]$) dans le cytoplasme par libération du calcium stocké dans le réticulum endoplasmique (Birch K.A. 1994). Cette élévation de $[Ca^{++}]$ peut-

être potentialisée si le signal inducteur est maintenu par entrée de calcium extracellulaire (Luckhoff A. 1992).

Vasodilatation - L'augmentation du $[Ca^{++}]$ libre induit l'activation de la phospholipase C A₂ (PLC A₂), permettant la synthèse d'acide arachidonique puis de prostanglandine (PGI₂ ou prostacycline) par les interventions successives de la cyclo-oxygénase 1 (COX1 ou prostanglandin H (PGH) synthase I) et de la prostacyclin synthase (Niu J. 2003). PGI₂ est un puissant EDRF et permet donc de relaxer le tonus des CML de la média (Egan K. 2006). D'autre part, cet effet est accentué par la production de NO par les CE. En effet, le Ca^{++} intra-cytoplasmique forme également un complexe avec la protéine adaptatrice calmoduline qui augmente l'activité de eNOS (Jagnandan D. 2005).

Perméabilité endothéliale – L'augmentation de la perméabilité endothéliale à l'exsudat fait intervenir l'activation de la voie des petites protéines G de la famille Rho (Ras Homologue) par les sous-unités $\beta\gamma$ des GPCR. En effet, l'activation des GPCR par l'histamine notamment favorise l'échange du GDP des formes inactives de Rho en GTP, par activation de Rho-GEF (Rho Guanine-nucleotide exchange factor) (Niu J. 2003). Rho-GTP actif induit alors l'activation de ROCK (Rho-dependant kinase) qui phosphoryle et inactive la phosphatase de la chaîne légère de la myosine (MLCP) (Stevens T. 2000).

En parallèle, l'augmentation du complexe calmoduline- Ca^{++} via la PLC β induit l'activation de la kinase de la chaîne légère de la myosine (MLCK) (Stevens T. 2000). La combinaison de ces 2 voies permet la phosphorylation de la chaîne légère de la myosine qui provoque la contraction des fibres d'actine attachées au niveau des jonctions serrées et adhérentes responsables de l'imperméabilité de l'endothélium au repos (Minshall R.D. 2006). Ainsi, la contraction des CE permet l'ouverture d'espaces entre les CE et l'écoulement de l'exsudat. Ce processus est particulièrement visible au niveau des veinules post-capillaires où l'expression des GPCR est la plus forte et où les jonctions serrées sont les moins denses (Heltianu C. 1982; Bazzoni G. 2004). Enfin, les protéines plasmatiques de l'exsudat s'assemblent en une matrice temporaire qui favorise l'attachement, la survie et la migration des neutrophiles (Frangogiannis N.G. 2006).

Recrutement des leucocytes –La phosphorylation de la chaîne légère de la myosine, en plus d'augmenter la perméabilité endothéliale, initie l'exocytose des corps de Weibel-Palade, assurant l'exposition de la P-sélectine à la face luminale des CE (Birch K.A. 1994). En parallèle, la réaction catalysée par la PLC A₂ suite à l'augmentation de $[Ca^{++}]$ génère le facteur d'activation plaquettaire (*platelet-activating factor* ou PAF) (Prescott S.M. 1984). La P-sélectine par interaction avec les molécules PSGL1 (*P-selectin glycoprotein ligand-1*) et sialyl Lewis X des neutrophiles permet l'accrochage de ces cellules à l'endothélium et PAF, via les intégrines $\alpha 4$, les attire par chimiotactisme et initie leur extravasation. Cette migration au niveau des jonctions inter-CE est également dépendante des molécules d'interactions PECAM1 (*platelet-endothelial cell adhesion molecule 1*, CD31) et CD99 (Schenkel A.R. 2002). Il a été démontré que le processus d'extravasation pouvait également se faire à

travers les CE (Nieminen M. 2006). Les mécanismes mis en jeu et l'importance relative de ces 2 voies d'extravasation ne sont cependant pas identifiés.

Coagulation – La « rétraction » des CE due à leur contraction permet l'exposition de molécules sous-endothéliales dont le facteur tissulaire (FT), entraînant le passage d'un phénotype au repos anti-coagulant à un phénotype activé pro-thrombotique car la fixation du facteur plasmatique VIIa au FT initie la cascade de la coagulation. De plus, le facteur de von Willebrand stocké dans les WPB est libéré lors de l'activation endothéliale et participe au recrutement des plaquettes sanguines (Rondaj M.G. 2006).

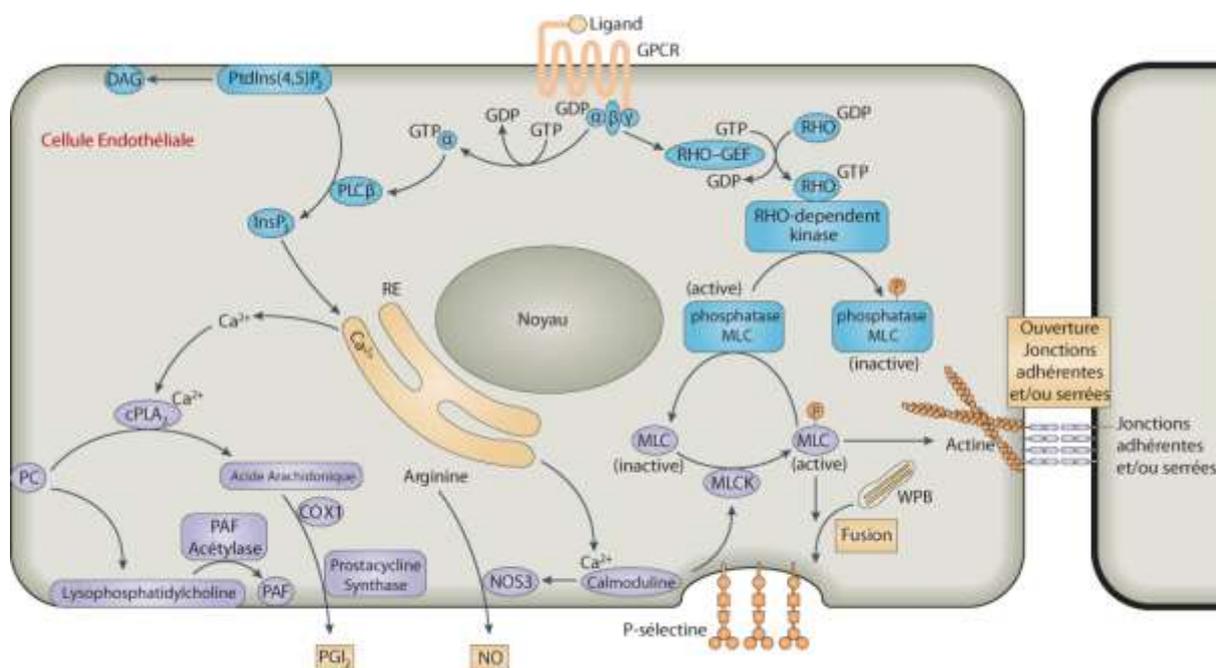


Figure 8. Activation au cours de la réponse inflammatoire aiguë de type 1 des Cellules Endothéliales (D'après Jordan S. Pober et William C. Sessa, 2007)

b) Type 2

Les signaux issus des GPCR ne durent que 10 à 20 minutes après quoi ils entrent en phase réfractaire pour éviter toute restimulation, conférant un caractère très transitoire de l'activation de type 1 (Gainetdinov R.R. 2004). Une réaction inflammatoire plus soutenue fait intervenir l'activation endothéliale de type 2 qui nécessite l'expression *de novo* de nombreuses protéines de chimiotactisme et d'adhérence. Les médiateurs classiques de cette activation sont les cytokines pro-inflammatoires *Tumor Necrosis Factor* (TNF) et l'interleukine 1 β (IL1 β) (Figure 9). Ces facteurs sont libérés principalement par les leucocytes activés sur le site inflammatoire (Pober J.S. 1990). La fixation du TNF sur son récepteur TNFR1 (ou CD120a) induit la formation d'un signalosome (complexe de molécules de signalisation) composé de TRADD (*TNFR-Associated via Death Domain*), la kinase RIP1 (*Receptor Interacting Protein*) et TRAF2 (*TNFR-Associated Factor 2*). Ce signalosome, par

l'intermédiaire de kinases, aboutit à l'activation des facteurs de transcription NFκB (*Nuclear Factor-κB*) et AP1 (*Activator Protein 1*) (Pober J.S. 2007).

L'IL1β se fixe quant à elle sur son récepteur IL1-R de type 1 (IL1-R1) pour former un complexe constitué de MyD88 (*Myeloid Differentiation primary-response gene 88*), TIRAP (*Toll/IL1 Receptor Accessory Protein*), IRAK1, IRAK4 (*IL1R-associated kinase 1, 4*) et TRAF6 (*TNFR-Associated Factor 6*) (Pober J.S. 2007). Il en résulte l'activation des mêmes facteurs de transcription NFκB et AP1 et initie ainsi l'expression de nombreux gènes (Martin M.U. 2002).

Comme l'activation de type 1, l'activation de type 2 contribue par sa régulation génique à la vasodilatation, à l'augmentation de la perméabilité et au recrutement leucocytaire.

Vasodilatation - La vasodilatation tout d'abord est potentialisée par l'induction de l'expression de COX2 qui présente la même activité que COX1, à savoir la formation de prostacycline mais avec une efficacité plus élevée (Mitchell J.A. 1995). La production du substrat de COX2 est maintenue au cours de cette phase d'activation par le maintien d'une forte [Ca⁺⁺] intra-cytoplasmique résultante de l'activation de type 1 (Zavoico G.B. 1989).

Perméabilité endothéliale – L'activation de type 2 est corrélée à une réorganisation du cytosquelette d'actine et de tubuline et est associée à un allongement des CE. Cette modification aboutit là encore à la formation d'espaces entre CE adjacentes et accentue l'écoulement de protéines plasmatiques volumineuses telles que le fibrinogène. Ce mécanisme est dépendant de NFκB mais les protéines néo-synthétisées requises ne sont pas clairement identifiées (Clark P.R. 2007).

Recrutement des leucocytes – Le recrutement des leucocytes est bien plus efficace durant cette phase que la précédente. Tout d'abord, les CE activées induisent l'expression des chimiokines IL8 (Interleukine 8 ou *CXC-chemokine ligand 8*, CXC-L8) et CCL5 (ou RANTES) (Ley K. 2006). Les CE peuvent également capturer les chimiokines synthétisées par d'autres cellules et les présenter sur leur face luminale par les protéoglycans. De plus, l'activation de type 2 induit l'expression de molécules d'adhérence telles que la E-sélectine dont la structure et la fonction sont très proches de la P-sélectine. Grâce à la combinaison PAF, IL8, E- et P-sélectines, les leucocytes sont alors plus efficacement attirés sur le site inflammé et adhèrent plus fermement à l'endothélium activé (Figure 10).

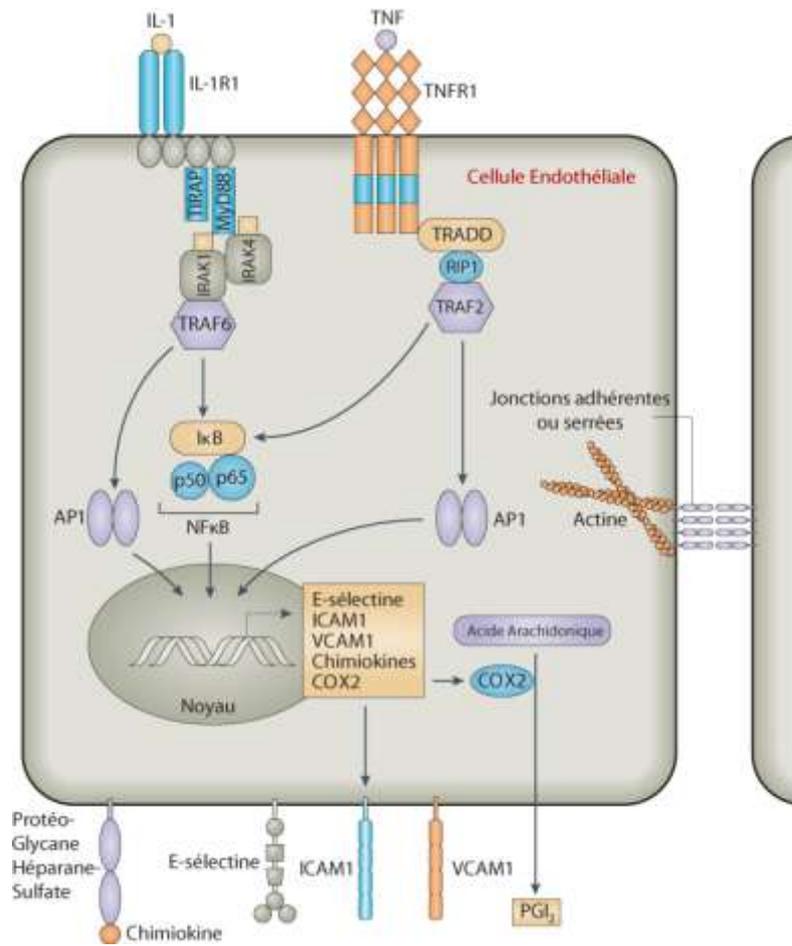


Figure 9. Activation au cours de la réponse inflammatoire aiguë de type 2 des Cellules Endothéliales
(D'après Jordan S. Pober et William C. Sessa, 2007)

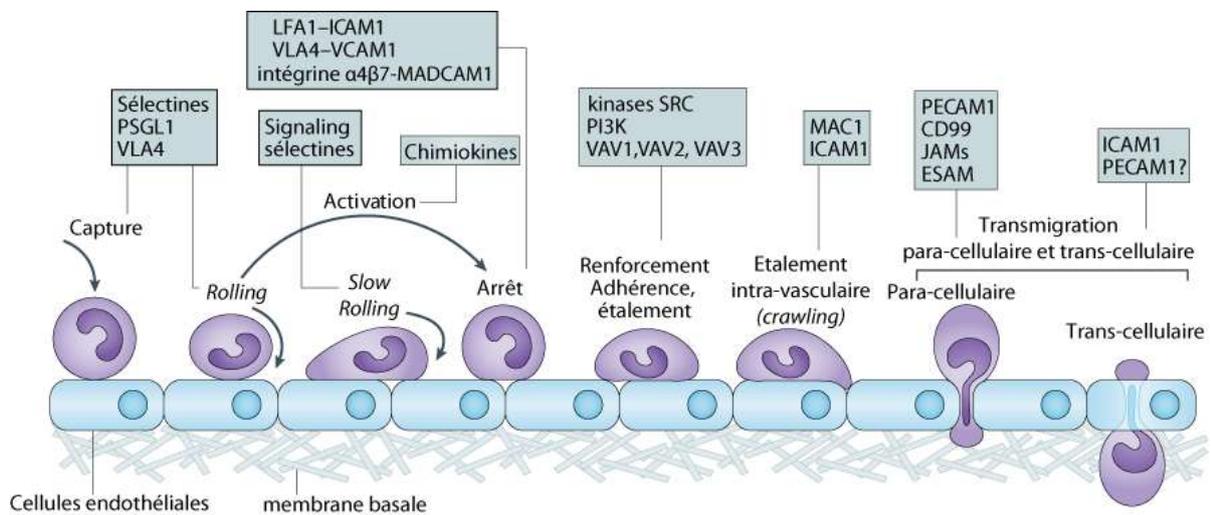


Figure 10. Cascade des molécules d'adhérence pour le recrutement leucocytaire par les Cellules Endothéliales
(D'après Klaus Ley *et al*, 2007)

c) Evolution de l'activation de type 2

Après quelques heures, les réponses des CE au TNF et à l'IL1 β évoluent. La synthèse de la E-sélectine est spontanément arrêtée et ce même si la présence de ces cytokine perdure. Ce mécanisme traduit une inactivation d'AP1 (Karmann K. 1996). L'évolution de la réponse inflammatoire au niveau des CE se fait par l'expression de molécules d'adhérence comme VCAM1 (*Vascular Cell Adhesion Molecule-1*) et ICAM1 (*Intercellular Cell Adhesion Molecule-1*) et de nouvelle chimiokine telle que CCL2 (*CC-Chemokine ligand 2* anciennement appelée MCP1). Cette transition de profil de molécules favorise l'enrichissement de l'infiltrat leucocytaire en monocytes, cellules dendritiques et lymphocytes entre 6 et 24h (Munro J.M. 1989). Ce sont effectivement ces cellules qui expriment les récepteurs CCR2 et CCR5 à CCL2 ainsi que les intégrines VLA4 (*Very-Late Antigen 4*) et LFA1 (*Lymphocyte Function-associated Antigen 1*) qui s'associent respectivement à VCAM1 et ICAM1. C'est maintenant cette combinaison de molécules qui permet le recrutement, l'adhérence, le roulement et la diapédèse des leucocytes. Après 24h, le maintien de sécrétion de molécules inflammatoires tels que le TNF ou IL1 β par les leucocytes activés commence à induire une toxicité vis-à-vis de l'endothélium, toxicité exacerbée si combinées à d'autres médiateurs tels que de l'interféron- γ (IFN γ) (Li J.H. 2005). L'activation endothéliale est alors associée à la dysfonction endothéliale. L'IFN γ facilite la mort des CE induite par le TNF par au moins 2 mécanismes. Tout d'abord, l'IFN γ augmente l'expression de la pro-caspase 8 (Li J.H. 2002). Or, l'activation de TRADD par le TNF permet après quelques heures le recrutement de FADD (*FAS-associated death domain*) et d'un complexe qui peut activer cette pro-caspase 8 (Micheau O. 2003). En temps normal, cette activation est inhibée par cFLIP (*Cellular caspase-8 (FLICE)-like inhibitory protein*) qui se lie de manière compétitive à FADD (Kreuz S. 2001). Une activation maintenue des CE par l'IFN γ va donc, à terme, favoriser l'interaction de la pro-caspase 8 à FADD et donc son activation. D'autre part, l'IFN γ induit la libération de cathépsine B des lysosomes. Cette protéine peut ensuite être activée dans le cytosol par la voie du TNF pour finalement induire une apoptose dépendante des mitochondries et indépendante de la caspase 8 (Kreuz S. 2001).

Les lésions endothéliales favorisent également la thrombose par démasquage du collagène et des protéines de la membrane sous-endothéliale. Le TNF amplifie également cette activation endothéliale en diminuant la synthèse de eNOS, de thrombomoduline et en induisant celle du Facteur Tissulaire, un des principaux initiateurs de la coagulation (Yoshizumi M. 1993; Sohn R.H. 2005). Alors qu'à court terme (phase aiguë de l'inflammation), la thrombose permet de limiter la dissémination d'agents infectieux et d'accentuer le recrutement leucocytaire, ce processus participe activement aux lésions endothéliales à plus long terme (plus de 24h).

Cette activation de type 2 perdure tant que les signaux pro-inflammatoires sont produits. La résorption physiologique de l'inflammation est rendue possible lorsque tout signal de danger est éradiqué. Des boucles de rétrocontrôle négatif se mettent alors en place pour inhiber l'expression des gènes pro-inflammatoires (Winsauer G. 2007).

3. Inflammation chronique

a) Rôle de cellules présentatrices d'antigènes

Dans le cadre d'une inflammation chronique, l'immunité innée est vite suppléée par les effecteurs de l'immunité adaptative. Dans ce contexte, les CE participent à l'activation des lymphocytes T mémoires circulants en jouant le rôle de Cellule Présentatrice d'Antigène (CPA). En effet, en réponse à des cytokines pro-inflammatoires tel que l'IFN γ , les CE expriment de fort taux de molécules de CMH de classe I et de classe II pour lesquelles la seule fonction connue reste la présentation antigénique (Choi J. 2004). De plus, les CE activées expriment des molécules de costimulation (ligands de CD2, ICOS, 4-1BB et OX40) responsables de la formation et de l'activation de LT (lymphocytes T) mémoires (Shiao S.L. 2005). Des tests *in vitro* confirment qu'en réponse à l'IFN γ , les CE humaines activées provoquent la libération de cytokines et la prolifération de LT CD4⁺ et CD8⁺ mémoires. Aucun effet n'est cependant observé sur les LT naïfs (Shiao S.L. 2005).

De plus, les CE pourraient jouer un rôle dans l'orientation Th1/Th2 de la réponse immunitaire. Dans un contexte cellulaire et cytokinique de type Th1 (ex. TNF et IFN γ), l'expression de la chimiokine CXCL10 par les CE est associée à son récepteur CXCR3 exprimé sur les LT effecteurs et effecteur-mémoires de type Th1. La E-sélectine également induite par ces stimuli favorise le recrutement des cellules T de type Th1 (Astrup F. 1997). A l'inverse, une réponse immunitaire de type Th2 est plutôt caractérisée par des LT CD4⁺ sécrétant de l'IL4, IL5 et/ou IL13. Or en réponse à ces cytokines, les CE synthétisent d'autres chimiokines dont CCL26 (eotaxine-3) et expriment VCAM1, ce qui favorise le recrutement de cellules de type Th2 et les éosinophiles (Chaplin D.D. 2002). L'effet de ces cytokines sur ces molécules est néanmoins réellement efficace qu'en combinaison avec le TNF (Briscoe D.M. 1992). Aussi, le rôle effectif des CE dans ce contexte reste à ce jour encore controversé.

b) L'angiogenèse

La génération de nouveaux vaisseaux (angiogenèse) est nécessaire pour assurer la survie durable des cellules inflammatoires présentes dans le tissu infecté ou lésé. Ce processus est initié par la migration des CE des veinules dans les tissus formant un nouveau plexus de capillaires. Dans ce contexte particulier, la principale source des facteurs angiogéniques (VEGFa, FGFb, angiopoïétine -1 & -2) est proposée être les LT activés et les monocytes/macrophages qui contrôlent ainsi leur propre survie (Monaco C. 2004). De plus, le TNF, dans le cadre d'une réponse inflammatoire chronique, interagit avec les récepteurs TNF-R2 et *etk* pour trans-activer (partiellement) VEGF-R2 et lui confère ainsi un rôle atypique pro-angiogénique (Fernandez L. 2008).

4. Les CE et l'organogénèse d'organes lymphoïdes tertiaires

On observe dans les tissus chroniquement inflammés la formation de structures lymphoïdes organisées en zone T et en zone B, typiques d'organes lymphoïdes (rate, ganglions lymphatiques) (Thaunat O. 2005). Les CE des veinules de ces organes lymphoïdes tertiaires (OLT) subissent une transformation de CE plates en cellules hautes comme celles retrouvées dans les veinules à haut endothélium (HEV) des ganglions lymphatiques. Ce changement de forme est régulé par la lymphotoxine β (LT β) (Drayton D.L. 2006). LT β interagit avec son récepteur LT β R sur les CE, récepteur appartenant à la super famille des récepteurs au TNF. Tout comme TNF-R1, LT β R conduit à l'activation de NF κ B en activant p50 (NF κ B1) et p65 (REL-A) (voie canonique). De plus, LT β R active la voie non canonique de NF κ B (p51 (NF κ B2) et RELB) par l'intermédiaire de NIK (*NF κ B-inducing kinase*). C'est cette dernière forme de NF κ B qui induit l'expression de HEC-GlcNAc6ST (*High-Endothelial-Cell-Associated Factor N-Acetylglucosamine 6-Sulphotransferase*), ligand de la L-sélectine (ou CD62L) (Figure 11). L'apparition de ce ligand sur ces CE de type HEV permet alors le recrutement de LT naïfs et de LT et LB mémoires qui ne pouvaient pas être recrutés par des CE « classiques » de veinules activées. Ces dernières s'organisent en zones distinctes T et B avec leurs cellules dendritiques respectives (myéloïdes et folliculaires). Enfin, la formation de vaisseaux lymphatiques est stimulée par la libération de VEGF de type C et de molécules de la famille du TNF. Ce processus permet ainsi la formation d'une structure lymphoïde dite tertiaire qui favorise le recrutement et l'activation des cellules immunitaires sur le site inflammé.

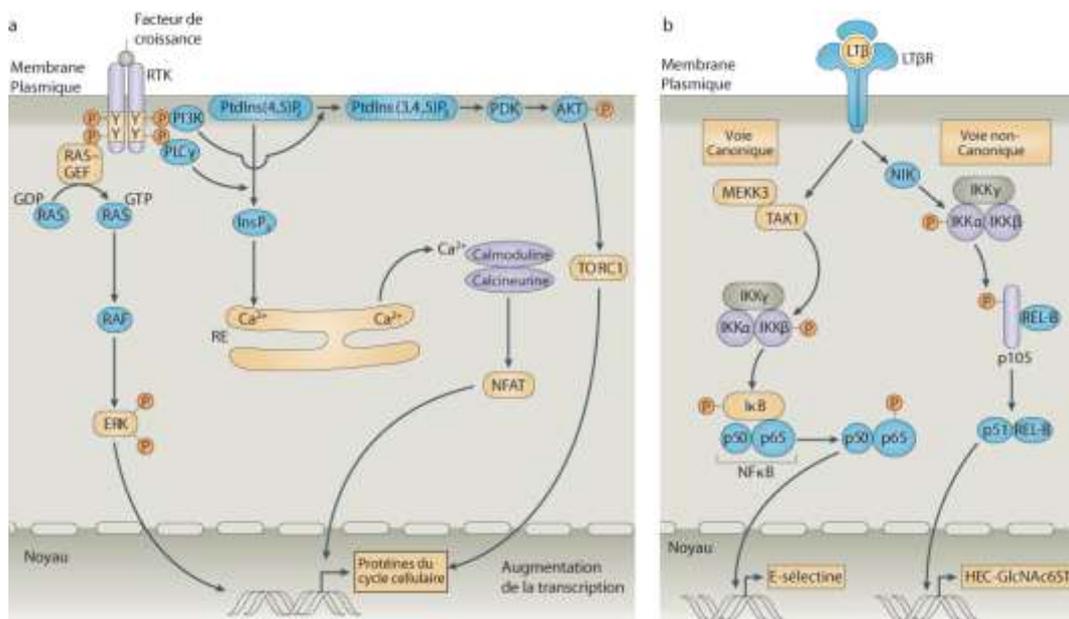


Figure 11. Voies de signalisation recrutées et activées dans les Cellules Endothéliales en réponse à l'inflammation chronique

(D'après Jordan S. Pober et William C. Sessa, 2007)

Implication centrale de l'endothélium dans l'artériosclérose du greffon

I. L'Artériosclérose du greffon

1. Définition

L'artériosclérose ou vasculopathie chronique du greffon (AG) est la cause principale de rejet d'organe transplanté à long terme (1 an post-greffe). En transplantation cardiaque, la prévalence de cette pathologie occlusive est de 10% à 15% à 1 an et de 40% à 50% à 5 ans suivant la greffe (Gao S.Z. 1989). L'AG est caractérisée par l'occlusion progressive de la lumière des artères, artérioles et capillaires par une prolifération concentrique et diffuse de cellules néo-intimales (Figure 12).

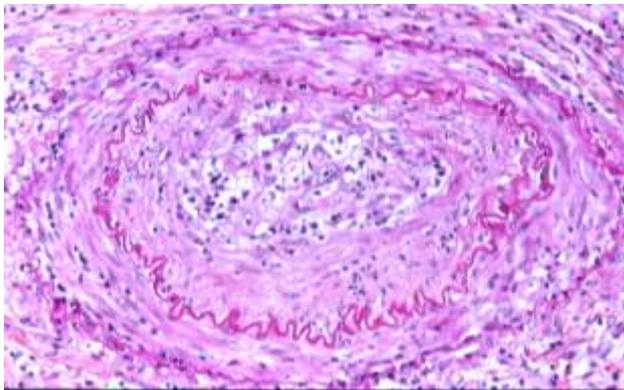


Figure 12. Coupe histologique d'artère artériosclérotique caractéristique de l'AG .

Occlusion totale de la lumière vasculaire par prolifération et migration des cellules néointimales

Par Dr. Anne Moreau, service d'anatomie-pathologie, CHU de Nantes

Cet épaissement est associé à une infiltration de cellules mononuclées (lymphocytes, macrophages), une accumulation intimale de cellules musculaires lisses, de myofibroblastes et de tissu conjonctif ainsi qu'une fibrose de la média. Dans le cadre d'une transplantation cardiaque, l'hyperplasie de la paroi vasculaire est observée dans tous les principaux vaisseaux épicaudiques et myocardiques avec une sévérité comparable tout au long de l'arbre coronaire épicaudique (Lin H. 1994). Pour ce qui est du rein, l'AG se retrouve également dans les artères, les artérioles, les capillaires périrubulaires et les floculus glomérulaires (Shimizu A. 2002).

Au cours de la progression de l'AG, les CML présents dans la néointima et responsables de l'épaississement de la paroi vasculaire ne présentent pas le même phénotype quiescent et contractile que les CML de la média (Cook C.L. 1994). En effet, elles acquièrent un profil prolifératif et producteur de matrice extracellulaire. Ce « switch » phénotypique régulé notamment par les cytokines TGF β et PDGF, est d'une part caractérisé par la diminution de l'expression de l'actine- α et la baisse du nombre de leur myofilaments conduisant à la baisse de contractilité. D'autre part, le réticulum endoplasmique rugueux et l'appareil de golgi se développent pour assurer une production aberrante de protéines de MEC.

L'origine de ces CML a depuis longtemps été sujette à débat. Comme pour d'autres modèles de remodelage vasculaire comme l'athérosclérose, les CML de la néointima ont d'abord été décrits comme issues de la média qui, dans ces contextes pathologiques, prolifèrent et migrent dans l'intima en réponse à de nombreux stimuli (ex. PDGF, ET-1, thrombin, FGF, IL-1, TGF β) (Hayry P. 1993). Cette observation est appuyée par les observations histologiques montrant une hyperplasie néointimale particulièrement développée au niveau des zones artérielles où la limitante élastique interne est rompue. Cette barrière physique perméable entre intima et média peut effectivement être déstabilisée dans le cadre d'une réaction inflammatoire, favorisant ainsi la migration des leucocytes dans les tissus sous-jacents. L'AG et l'athérosclérose sont des pathologies de remodelage vasculaire fortement associés à l'inflammation, notamment de par les nombreuses cytokines libérées (ex. TNF, IL1 β , IL6, IFN γ) au niveau des vaisseaux atteints. Ce microenvironnement propice à l'augmentation de la perméabilité de la limitante élastique interne favorise ainsi fortement l'infiltration de l'intima par les CML de la média. L'origine des disparités fonctionnelles des CML de la néointima et de la média ont été également été expliquées par une hétérogénéité des CML néointimales et médiales qui, notamment en réponse à des facteurs comme le PDGF ou le TGF β , proposent respectivement des fonctions contractiles, prolifératives et de synthèse de MEC (Hao H. 2003).

En transplantation, les CML intimes de l'AG peuvent également être issues du receveur et non du greffon. En fait, dans différents modèles d'allogreffes de cœur et d'aorte chez les rongeurs, la grande majorité de ces CML dérivent du receveur (prévalence de 50% à plus de 95%) (Figure 13).

Espèce	Modèle	Organe	Type Cellulaire	Origine	Prévalence (%)	Identification	Référence
Humain	Allo-Tx en sex-mismatched (Homme/Femme)	Cœur	CML, CE	receveur	<5	Sonde Y	Hruban RH, 1993
Humain	Allo-Tx en sex-mismatched (Homme/Femme)	Cœur	CML, CE	receveur	5-10	Sonde Y/SMA	Glaser R, 2002
Humain	Allo-Tx en sex-mismatched (Homme/Femme)	Cœur	CML	receveur	60	Sonde Y/SMA	Quaini F, 2002
			CE	receveur	42	Sonde Y/ facteur VIII	Grimm PC, 2001
Humain	Allo-Tx en sex-mismatched (Homme/Femme)	Rein	CML	receveur	80-90	Sonde Y/SMA	Grimm PC, 2001
Rat	Allo-Tx	Artère Fémorale	CML	receveur	100	CMH I	Brazelton TR, 1999
Rat	Allo-Tx en sex-mismatched (Mâle/Femelle)	Cœur	CML	receveur	>95	PCR chrY/SMA	Hillebrands JL, 2000 & 2001
			CE	donneur	>95	CMHI/HIS52	
Rat	Allo-Tx en sex-mismatched (Mâle/Femelle)	Aorte	CML	receveur	>95	PCR chrY/SMA	Hillebrands JL, 2001
			CE	receveur	>95	CMHI/HIS52	
Rat	Allo-Tx entre rats avec chimérisme MO	Aorte	CE	receveur (non dérivées MO)	>95	CMHI/HIS52	Hillebrands JL, 2002
				receveur (dérivées MO)	<5		
Rat	Allo-Tx entre rats avec chimérisme MO	Aorte	CML	receveur (non dérivées MO)	>95	CMHI/SMA	Hillebrands JL, 2003
Souris	Allo-Tx après traitement anti-CD4 et anti-CD8	Cœur	CML, CE	donneur	ND	CMH II	Hasegawa S, 1998
Souris	Allo-Tx en sex-mismatched (Mâle/Femelle)/chimérisme MO	Aorte	CML	receveur (non dérivées MO)	>95	Sonde Y/SMA	Li J, 2001
Souris	Tx Veine en sex-mismatched (Mâle/Femelle)/chimérisme MO/ Souris Transgéniques	Veine	CML	donneur	60	LacZ/Sonde Y/SMA	Hu Y, 2002
				receveur (non dérivées MO)	40		
Souris	Allo-Tx entre souris avec chimérisme MO	Cœur	CML	receveur	≈88	LacZ/GFP/SMA	Sata M, 2002
				dérivées MO	≈82		Saiura A, 2001
Souris	Allo-Tx en sex-mismatched (Mâle/Femelle)/Souris Transgéniques	Cœur	CML	receveur	>50	LacZ/Sonde Y/SMA	Sata M, 2002
Souris	Allo-Tx entre souris avec chimérisme MO/Souris Transgéniques	Aorte	CML	receveur	>95	LacZ/SMA	Shimizu K, 2001
				dérivées MO	11		
Souris	Induction ischémie cardiaque	Cœur	CML	Cellules lin ⁺ c-kit ⁺ de MO	ND	GFP/SMA	Orlic D, 2001
Souris	Induction ischémie cardiaque	Cœur	CE	Cellules SP dérivées MO	3,3	LacZ/Flt-1	Jackson KA, 2001

Figure 13. Origine de cellules néo-intimales dans divers modèles d'étude (MO : Moëlle osseuse) (D'après Hillebrands JL, 2003)

Néanmoins, dans ces modèles, peu ou pas de traitements IS sont appliqués, provoquant ainsi des d'importantes lésions des CE et des CML du donneur (Shimizu K. 2001). Ces pratiques expérimentales sont susceptibles de biaiser la relevance de ces résultats chez l'Homme chez qui l'immunosuppression est importante et systématique pour, précisément, limiter ces lésions vasculaires. Toutefois, en utilisant la technique de l'hybridation in situ pour le chromosome Y après une transplantation cardiaque entre deux individus de sexe différent, trois études indépendantes ont montré chez l'Homme que 3% à 15% des CML néo-intimales étaient dérivées du receveur (Glaser R. 2002; Quaini F. 2002; Minami E. 2005). Pour des raisons inconnues, ces valeurs sont doublées dans le cadre d'une transplantation rénale (Grimm P.C. 2001).

De plus, ces CML expriment des marqueurs de cellules progénitrices dérivées de la moelle osseuse (CD34, Thy-1, c-kit et flt3) (Miyamoto T. 1997). Cette origine hématopoïétique est également en adéquation avec l'observation que les CML néointimales sont oligo-clonales (Owens G.K. 1995).

Le processus de remodelage vasculaire de l'AG est souvent comparé à celui de l'athérosclérose (Figure 14). Bien que les cellules mises et les mécanismes en jeu semblent très proches, d'importantes différences sont décrites. La principale d'entre elles se situe tout d'abord au niveau de la géométrie de l'hyperplasie néointimale que l'on retrouve dans les 2 pathologies. En effet, alors que l'épaississement de la paroi est local dans l'athérosclérose, précisément au niveau de la plaque d'athérome, ce processus est quant à lui diffus et concentrique dans l'AG (Hayry P. 1993; Lin H. 1994). Un autre point majeur de dissemblance est la cinétique d'apparition et de développement. En effet, les premières lésions de l'AG peuvent apparaître après 1 à 2 semaines après la greffe (infiltrat intimal, synthèse anormale de MEC). La progression de ce remodelage provoque les premiers signes cliniques de perte de fonction du greffon dans les 10 premières années post-transplantation. En contraste, les plaques d'athérome naturelles se développent plus lentement. Il est aujourd'hui estimé chez l'Homme que l'initiation des lésions athéromateuses (apparition des cellules spumeuses (stade I)) est séparée des signes cliniques (déstabilisation de la plaque) d'environ 4 décennies. Enfin, les disparités entre les nombreux facteurs favorisant les développements respectifs de l'AG et de l'athérosclérose indiquent que les mécanismes mis en jeu lors de l'initiation de ces pathologies sont différents. Toutefois, une des composante clé dans la progression de ces 2 remodelages vasculaires est la dysfonction endothéliale associée à un état d'inflammation chronique.

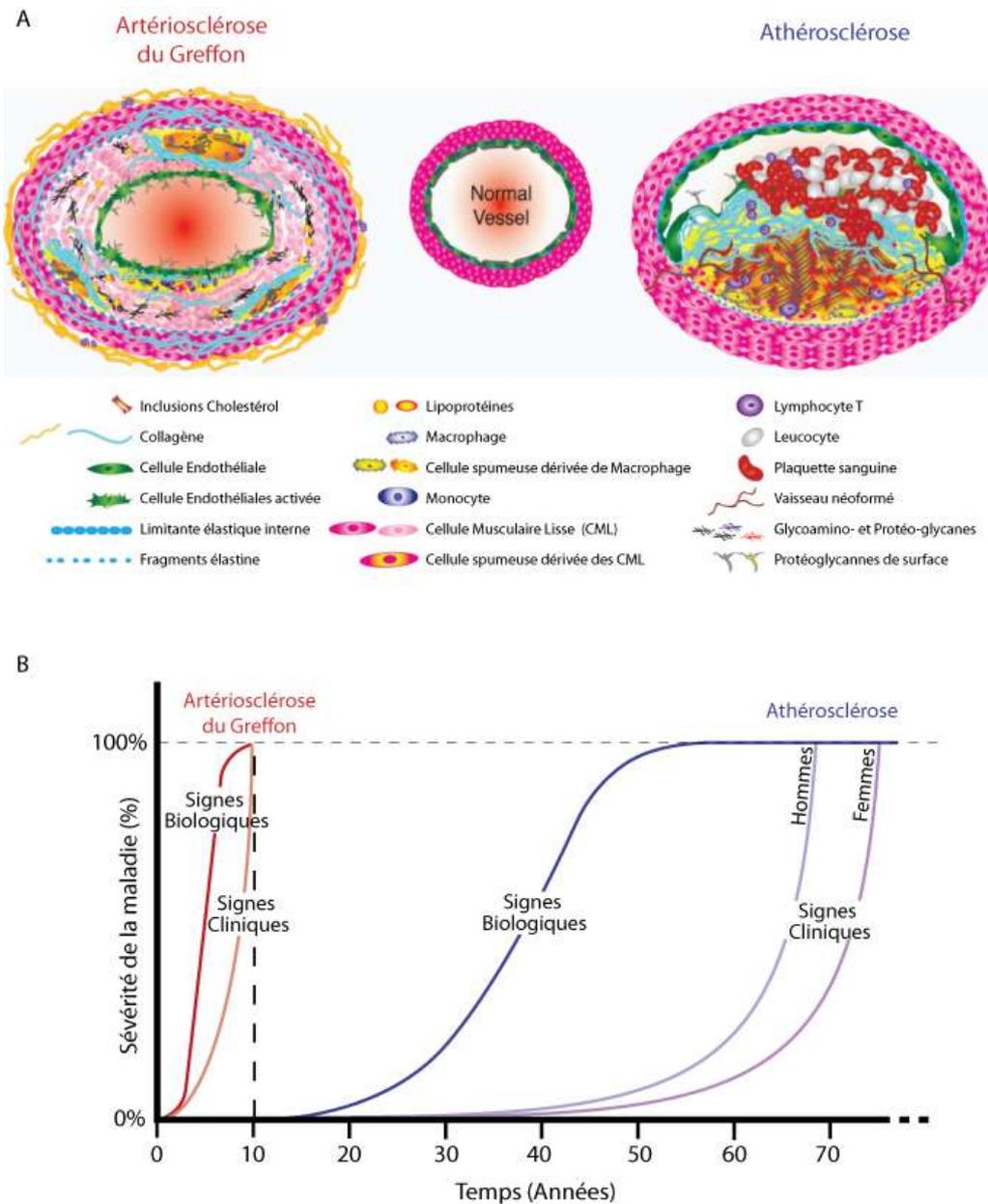


Figure 14. Différences majeures et points communs entre Artériosclérose du Greffon et Athérosclérose

A. Différence histologique des lésions de AG et d'Athérosclérose (concentrique pour AG versus local pour l'Athérosclérose)

B. Différence de cinétique d'apparition des signes biologiques (remodelage) et cliniques entre AG et Athérosclérose

(D'après Maziar Rahmani *et al.*, 2006)

2. Facteurs impliqués dans le développement de l'AG

a) Immunologiques

Rejets Aigus

Dans ce contexte particulier de la transplantation, les CE et les CML sont les premières cibles potentielles des réactions immunes dirigées contre le greffon. Même si les IS permettent de prévenir efficacement la survenue du rejet aigu du greffon, il subsiste des épisodes locaux de rejet qui ne sont

pas totalement inhibés par ces traitements. Sans pour autant donner lieu à la perte fonctionnelle du greffon, ils peuvent entraîner des lésions vasculaires ou/et être à l'origine d'un environnement inflammatoire propice à la mise en place et au développement de l'AG.

Ainsi, parmi les principaux facteurs à risque dont dépend la survenue de l'AG, on retrouve des éléments directement dépendants des alloantigènes. Le nombre de « mismatch » HLA (human leukocyte antigen), le nombre d'épisodes de rejet, leur durée et leur précocité après la greffe sont des paramètres clés dans l'initiation de l'AG. En effet, chez l'Homme, la survenue précoce d'épisodes de rejet modérés à sévères est significativement associée à l'incidence de l'AG (Stoica S.C. 2006). Les mécanismes mis en jeu sont toutefois encore peu définis et sujets à controverse. Par exemple, l'implication des lymphocytes, et plus particulièrement des lymphocytes CD8 (population cytotoxique) a d'abord été réfutée dans un modèle d'allogreffe cardiaque chez le rat puis dans un modèle de greffe d'aorte chez la souris (Forbes R.D. 1994; Ensminger S.M. 2002). A l'inverse, Allan *et al* montre dans un modèle de greffe cardiaque chez le porc incompatible pour le CMH de classe I que l'utilisation d'un anticorps anti-CD8 déplétant permet de limiter ou de retarder l'AG (Allan J.S. 1997). La participation de ces lymphocytes a également été montrée dans le développement de l'AG dans des modèles de blocage de costimulation chez la souris (Zhai Y. 2002; Ito T. 2005). Plus récemment, il apparaît que les lymphocytes CD8 suffisent à induire l'AG chez la souris en provoquant des lésions vasculaires de manière indépendante des lymphocytes CD4 mais dépendante d'IFN γ (Schnickel G.T. 2004).

Le rôle de la réponse immune à médiation humorale, c'est-à-dire médiée par les anticorps a également été étudié dans le développement de l'AG. Dès 1992, une corrélation entre des anticorps circulants anti-endothéliaux et l'AG a été établie. 2 ans après la greffe, ces anticorps, retrouvés dans 15/21 des cœurs transplantés présentant de l'AG, reconnaissent la protéine des filaments intermédiaires de la vimentine des CE. A l'inverse, dans les greffons sans signe d'AG, seulement 1/21 présentait ces anticorps. Néanmoins, après 5 à 10 ans post-transplantation, il n'y a plus de corrélation entre la présence d'anticorps anti-EC et la survenue de l'AG, ni même d'épisodes de rejet aigu (Jurcevic S. 2001). Le fait que ces anticorps reconnaissent un épitope de protéine intra-cytoplasmique suggère que leur apparition fait suite à une lésion endothéliale. D'autres anticorps anti-donneur ont également été retrouvés chez les receveurs développant l'artériosclérose. En effet, parmi une cohorte de 285 patients transplantés cardiaques, une forte association a été établie par Vasilescu entre l'AG et la génération d'anticorps anti-HLA de classe II (Vasilescu E.R. 2004). De plus, une corrélation significative a été rapportée entre les épisodes multiples de rejet, la présence d'anticorps anti-HLA et de formes solubles des molécules HLA dans le sang avec le développement de l'AG (Reed E.F. 1996). Par ailleurs, la présence d'anticorps IgG anti-HLA (et non IgM), dans le plasma des patients greffés implique l'activation de LT CD4 de type helper et suggère là encore l'implication de la réponse immune à médiation cellulaire (médiée par les lymphocytes) dans le développement de l'AG.

De même, la présence d'anticorps dirigés contre le greffon est bien caractérisée dans de nombreux modèles expérimentaux. Chez la souris notamment, le transfert d'IgG anti-donneur à des animaux déficients en immunoglobuline ayant reçu une greffe cardiaque et traités avec un anticorps anti-CD4 (protocole d'induction de survie à long terme du greffon sans AG) est suffisant pour provoquer l'AG (Hancock W.W. 1998). Cet effet n'est observé que quand ce transfert est réalisé avant l'induction des gènes protecteurs HO1, A20 et Bcl-XL par le traitement anti-CD4. Pourtant, en fonction des modèles expérimentaux, ces anticorps anti-donneur ne suffisent pas toujours à induire la pathogénie de l'AG. Encore chez la souris, dans un modèle de greffe aortique déficient en Fas-L, aucun signe d'AG n'est observé alors que des titres plasmatiques élevés d'anticorps cytotoxiques anti-donneur sont détectés (Subbotin V. 1999). De plus, les receveurs CD40^{-/-} de greffes aortiques perdent leur greffe par artériosclérose malgré leur incapacité à générer une réponse humorale par des IgG anti-donneur (Ensminger S.M. 2001).

En résumé, la présence d'anticorps anti-HLA et anti-CE du donneur est avérée en transplantation cardiaque et corrèle chez l'Homme à la perte du greffon. En clinique, un des marqueurs les plus fiables de l'AG est d'ailleurs le facteur du complément C4d dont la présence traduit la reconnaissance du greffon par ces anticorps (David-Neto E. 2007). Ce qui reste toutefois incertain, c'est leur rôle précis dans la pathogénie de l'AG. Autrement dit, est-ce qu'ils jouent véritablement un rôle cytotoxique ou bien sont-ils « juste » le reflet de lésions endothéliales comme il arrive parfois après un infarctus du myocarde que des auto-anticorps soient produits, sans pour autant être à l'origine de pathologies auto-immunes.

Bien que fortement associés à l'AG, l'implication de ces mécanismes de rejet à médiation cellulaire ou/et humorale est encore mal définie. En plus de ces mécanismes immunologiques spécifiques de l'antigène du donneur, il est également clairement démontré que d'autres facteurs non immunologiques et non spécifiques du donneur sont associés à l'AG. Par exemple, la survenue de l'AG en réponse à l'ischémie froide dans un modèle d'isogreffe cardiaque chez la souris (greffe entre deux individus génétiquement identiques) suggère une composante non immunologique dans l'initiation et la progression de cette pathologie.

b) Non immunologiques

Inflammation

L'inflammation est une composante indissociable du développement de l'AG. Dès l'acte chirurgical et l'ischémie/reperfusion subie par le greffon, une réaction inflammatoire est initiée et est susceptible de conditionner la survie à court et à long terme du greffon. Comme décrit précédemment, l'inflammation est à l'origine du développement de réactions immunitaires et peut donc être un acteur majeur dans les mécanismes de rejets aigus et chroniques en favorisant la reconnaissance du greffon et, à terme, son rejet par le système immunitaire du receveur.

L'implication centrale de l'inflammation dans l'AG a été démontrée par l'association entre des taux plasmatiques élevés de protéine C réactive (CRP) et l'AG (Pethig K. 2000; Labarrere C.A. 2002; Hognestad A. 2003). En effet, la CRP est une protéine synthétisée uniquement par le foie au cours d'une réaction inflammatoire et sert aujourd'hui de bio-marqueur de l'inflammation (Gabay C. 1999). Elle joue un rôle pro-inflammatoire aussi bien sur les CE, les CML et les monocytes/macrophages : La CRP induit l'expression de molécules d'adhérence (VCAM-1, ICAM-1, E-sélectine) et diminue l'expression de eNOS dans les CE (Pasceri V. 2000; Venugopal S.K. 2002). Au niveau des CML, la CRP augmente l'expression des récepteurs à l'angiotensine I, la génération de *reactive oxygen species* (ROS) et la prolifération (Wang C.H. 2003). Enfin, les monocytes/macrophages traités avec de la CRP relarguent plus de TF, et donc potentiellement favorise ainsi leur migration, leur recrutement et leur adhérence sur les CE (Cermak J. 1993). De plus la synthèse de TF induisant la formation de thrombine pourrait constituer l'origine de l'association entre l'apparition dès le premier mois après la greffe de dépôts de fibrine et la survenue de l'AG. Ces résultats *in vitro* et l'association entre un taux plasmatique élevé de CRP et la survenue de l'AG suggère donc un rôle de cette protéine et de l'inflammation dans la pathogenèse de l'AG.

Cette hypothèse est également confortée par les rôles déterminants des cytokines pro-inflammatoires dans l'AG. En effet, le développement de l'AG nécessite la présence de cytokines de type th1 tels que l'IFN γ et le TNF. Dans des modèles expérimentaux où la production d'IFN γ est bloquée (souris KO, injection d'un anticorps bloquant anti-IFN γ), l'AG ne se développe plus (Russell P.S. 1994; Nagano H. 1997; Nagano H. 1998). Tellides montre également en greffant un morceau d'artère humaine chez une souris immunodéficiente que l'IFN γ , sans autre signe d'inflammation, est suffisant pour induire l'artériosclérose (Tellides G. 2000). Là encore, malgré ces résultats montrant l'importance de cette cytokine dans le développement de ce processus, il est difficile de déterminer à quel niveau précis l'IFN γ joue son rôle. En effet, l'IFN γ a des effets pleiotropiques. Il régule l'activation de nombreux types cellulaires (neutrophiles, lymphocytes, CD, CE...) et permet l'induction d'expression des molécules de CMH et de costimulation ainsi que de nombreuses molécules d'adhérence, de cytokines, de chimiokines et de MEC. La synthèse d'IFN γ quant à elle est réalisée par les lymphocytes CD8 cytotoxiques (Tc1), les LT CD4 Th1, les NK, les macrophages activés mais également par les CML en réponse à l'IL12 et l'IL18.

Tout comme l'IFN γ , le TNF joue également un rôle essentiel dans l'AG. Les greffons déficients pour les 2 récepteurs au TNF ne développent pas d'AG, et ce même en présence d'inflammation et d'IFN γ (Suzuki J. 2003). De plus, comme l'inactivation de ces récepteurs n'a pas d'effet quand elle est restreinte aux cellules du receveur, cela suggère que le TNF joue son rôle pro-AG probablement en favorisant l'activation, la dysfonction, l'apoptose et/ou la prolifération des cellules du greffon (Pober J.S. 2007).

Alors qu'il est aujourd'hui clair que l'inflammation joue un rôle majeur dans l'initiation et la progression de l'AG, il reste à déterminer quelles sont les causes potentielles de cette réaction inflammatoire.

La principale des causes inflammatoires est l'ischémie/reperfusion du greffon au moment même de la transplantation. L'organe transplanté est vulnérable à la durée de l'ischémie, la qualité de la préservation pendant le transport, la quantité de catécholamines utilisée pour permettre de réamorcer la fonction cardiaque (cas particuliers de l'allogreffe cardiaque) et la reperfusion elle-même (Valantine H.A. 2003).

Trois phases séquentielles contribuent aux lésions ischémiques du greffon. (1) L'épisode d'ischémie « chaude » au prélèvement de l'organe chez le donneur. (2) L'intervalle d'ischémie froide pendant la phase de préservation et de transport. (3) La période d'ischémie « chaude » au moment de la greffe chez le receveur. Paradoxalement, alors que la reperfusion est requise pour restaurer l'oxygénation des tissus, elle est également accompagnée d'un grand stress oxydatif pouvant activer et léser les cellules vasculaires (Land W. 1994). Les lésions ainsi occasionnées sont certainement à l'origine du processus d'artériosclérose en favorisant l'adhésion plaquettaire, la libération de facteurs de croissance et de cytokines pro-inflammatoires favorisant à leur tour la surexpression des molécules de CMH, le relargage d'antigènes du donneur, l'induction de molécules d'adhérence et ainsi la reconnaissance du greffon par le système immunitaire (Valantine H.A. 2003).

La libération de cytokines pro-inflammatoires si délétères pour la survie du greffon est également induite après la mort cérébrale du donneur qui induit de multiples modifications hémodynamiques, métaboliques et neuro-hormonales (Gasser M. 2000). Ces changements sont associés à l'augmentation de catécholamines qui induisent une vasoconstriction, la production de cytokines pro-inflammatoires, de chimiokines et de molécules d'adhérence par les CE du greffon.

Une fois le greffon transplanté, l'inflammation générée va grandement favoriser les réponses immunes dirigées contre le greffon. Malgré l'emploi d'IS, les épisodes de rejet vont à leur tour entretenir les conditions inflammatoires indispensables au développement de l'AG.

Toxicité IS

Alors que les traitements IS sont aujourd'hui indispensables pour limiter l'inflammation et inhiber les réponses immunitaires aiguës dirigées contre le greffon, ils occasionnent également à long terme d'importantes lésions au niveau du greffon (Mollison K.W. 1998). En particulier dans le cadre de la greffe rénale, la cyclosporine A et ses dérivés (inhibiteurs de la calcineurine) sont effectivement responsables de l'induction d'apoptose des CE et de cellules des tubules (Woywodt A. 2003). Cet effet secondaire de néphrotoxicité est très délétère et c'est pourquoi d'importants efforts sont réalisés à la fois pour mettre au point de nouvelles molécules moins toxiques et à la fois pour réduire dès que

possible les doses d'immunosuppresseurs données aux patients. Cette diminution de l'immunosuppression est également un enjeu crucial pour limiter la survenue de pathologies secondaires inhérentes à ces traitements telles que les infections et les cancers.

Hyperlipidémie, diabète, hypertension

Beaucoup des patients transplantés sont hyper-lipidémiques avant la greffe. De plus, les traitements IS et plus particulièrement les inhibiteurs de calcineurine peuvent également induire ou exacerber l'hyperlipidémie. Chez le lapin, l'hypercholestérolémie a été associée à la survenue d'AG et induit la prolifération néointimale que l'on retrouve chez les patients présentant de l'AG (Esper E. 1997). Tout comme chez les patients non transplantés qui développent de l'athérosclérose, ces facteurs lipidiques mais également les désordres métaboliques menant à l'hyperglycémie comme le diabète sont fortement associés à l'AG (Valantine H. 2001). Les mécanismes ne sont pas clairement définis. Il apparaît toutefois que ces éléments contribuent à l'artériosclérose *via* la dysfonction de l'endothélium en altérant la production de NO et en maintenant ainsi une vasoconstriction. Pour ce qui est de l'hyperglycémie en particulier, un des mécanismes décrits est la production de AGE (*Advanced Glycation End-Products*) qui, soit directement, soit en se fixant à leur récepteur RAGE, peuvent provoquer la production de ROS (Jandeleit-Dahm K. 2008). Le stress oxydatif ainsi induit, et ce notamment au niveau des CE, est susceptible de provoquer l'activation endothéliale et la production de cytokines pro-inflammatoires dont l'AG est très dépendant (Taniyama Y. 2003).

Qualité du greffon

Il a également été rapporté que la qualité du greffon, l'âge du donneur ainsi que celle du receveur étaient des paramètres qui pouvaient influencer sur la survie du greffon et la survenue de l'AG.

Infections

Plusieurs études indiquent que des infections virales (cytomégalovirus (CMV), adénovirus, parvovirus, herpes simplex) peuvent avoir une forte incidence sur l'AG. La participation des infections virales et particulièrement de l'infection au CMV dans la pathogenèse de l'AG a été identifiée suite à des données épidémiologiques, cliniques et expérimentales (Lemstrom K. 1993; Valantine H.A. 1999). La présence de CMV au moment de la transplantation est un signe majeur pour prédire la survie du greffon et la survenue de l'AG. C'est le groupe de Stanford qui décrit pour la première fois cette relation, par l'observation que 28% des patients infectés au CMV développent de sévères lésions obstructives des artères coronaires alors que ce pourcentage tombe à 10% chez les patients non infectés (Grattan M.T. 1989). Par la technique de l'hybridation *in situ*, il a ensuite été démontré que la présence de CMV était plus fréquente dans les greffons artériosclérotiques que dans les greffons cardiaques « sains » (Wu T.C. 1992). L'infection au CMV induit des modifications microvasculaires (inflammation sous-endothéliale) dans les biopsies de l'endomyocarde du greffon et ces modifications sont corrélées au développement de l'AG (Koskinen P. 1994).

D'autre part, dans une autre étude plus récente utilisant des biopsies issues, là encore, de l'endomyocarde mais cette fois chez l'enfant, la présence de génome adénoviral est associé à un risque 6 fois plus élevé de développer de l'artériosclérose, suggérant également un rôle important des infections virales dans ce processus (Shirali G.S. 2001). Des essais cliniques ont été réalisés dans des modèles animaux mais également chez l'Homme pour valider cette hypothèse. Ainsi, l'administration prophylactique de ganciclovir qui bloque la réplication virale pendant les 28 premiers jours après la greffe, induit une baisse de la fréquence d'AG en comparaison avec le placebo (Valantine H.A. 1999).

Quels mécanismes sont mis en jeu par les virus pour favoriser le développement de l'AG ?

Les virus Herpès et plus particulièrement le CMV ont des caractéristiques qui favorisent l'inflammation et donc les lésions des cellules du greffon qui amènent à l'artériosclérose. Ces caractéristiques particulières sont la dépendance aux réponses immunitaires adaptatives du receveur pour assurer leur élimination et leur état de latence, la capacité d'induire la production de chimiokines pro-inflammatoires et de moduler l'expression d'eNOS dans les CE. En effet, chez l'Homme, le CMV a un tropisme élevé pour les CE vasculaires (Epstein S.E. 1999). L'infection des CE par ce virus induit l'augmentation de l'expression constitutive de la protéine d'adhérence ICAM1 en agissant directement au niveau du promoteur de ce gène (Burns L.J. 1999). Tout comme l'inflammation, l'infection des CE par le CMV induit le recrutement, la trans-endothélialisation et l'activation de monocytes tout en favorisant la coagulation (Knight D.A. 2000). Au niveau de la vasomotricité, l'infection au CMV diminue la production endothéliale de NO en réduisant l'expression d'eNOS (Valantine H.A. 2004).

Tous ces éléments montrent donc bien en quoi l'inflammation joue un rôle central dans la pathogenèse de l'AG. Que ce soit les épisodes de rejets, l'ischémie/reperfusion, l'hypercholestérolémie, l'hyperglycémie ou les infections, l'inflammation aiguë/chronique et ses répercussions sur la biologie endothéliale semblent donc être le dénominateur commun qui est probablement à l'origine de l'initiation et de la progression de l'AG.

3. Dysfonction Endothéliale liée à la production de NO

La dysfonction endothéliale correspond généralement dans la littérature à l'altération de la production de NO par les CE. Comme décrit précédemment, le NO est un médiateur central dans le contrôle de la vasomotricité et de l'inflammation en inhibant l'adhésion et l'activation leucocytaire, la coagulation, la production de cytokines pro-inflammatoires tout en inhibant la prolifération et la contraction des CML (Vallance P. 1989; Kubes P. 1991). Les facteurs immuns et non immuns impliqués dans l'AG comme les infections au CMV ou l'hyperlipidémie/hyperglycémie sont tous associés à une dysfonction endothéliale reflétée par la forte diminution de la production de NO par les CE (Vejlstrup N.G. 2002).

La réduction de la NOS que l'on retrouve dans l'AG est accompagnée d'une augmentation de la contraction des CML, et donc une augmentation de la pression artérielle. Elle inhibe également la vasodilatation dépendante des CE. A l'inverse, expérimentalement, une synthèse accrue de NO permet de limiter voire même d'empêcher le développement de remodelage vasculaire comme l'athérosclérose et la resténose (Cooke J.P. 1992; von der Leyen H.E. 1995). Dans des modèles pré-cliniques d'AG, une déficience en NO (par inhibition de iNOS) accélère le développement de l'hyperplasie néo-intimale et donc l'AG (Shears L.L. 1997). Là encore, la surexpression précoce de iNOS par transfert de gène *ex-vivo* prévient le développement de l'hyperplasie néo-intimale (Shears L.L. 1997). eNOS est la NOS constitutive des CE. De même que pour iNOS, son altération dans un modèle murin d'allogreffe de cœur issu de souris eNOS^{-/-} accélère la survenue de l'AG (Lee P.C. 2000). A l'inverse, chez le lapin, la surexpression de eNOS par transfert de gène via des liposomes permet efficacement de réduire les lésions dues à l'ischémie/reperfusion et de ralentir l'AG même en l'absence d'immunosuppression (Iwata A. 2001).

La synthèse de NO est donc un élément important dans le contrôle de l'AG, en maintenant les CE dans un phénotype anti-aggrégant pour les cellules immunitaires et les plaquettes ainsi qu'en bloquant la migration et la prolifération des CML. Au cours de l'AG, l'expression de eNOS et de iNOS est diminuée et donc la dysfonction endothéliale dont est issue cette altération est un événement cruciale dans la progression de l'AG.

4. Activation Endothéliale

Comme présentés précédemment, le rôle de l'inflammation et des cytokines pro-inflammatoires dans le développement de l'AG est central. Or une des cibles stratégiques majeures de ces facteurs sont les CE. Les CE vont donc être activées notamment par le TNF et l'IFN γ libérés lors de la transplantation elle-même puis localement tout au long de survie du greffon que ce soit par les épisodes de rejets ou les infections au CMV par exemple, qui maintiennent un environnement pro-inflammatoire.

Cette activation va alors elle-même entretenir ce processus en favorisant la reconnaissance du greffon par les cellules immunitaires du receveur. En effet, comme détaillé précédemment, l'activation endothéliale concourt au recrutement de ces cellules effectrices dans le greffon et à la présentation des antigènes du greffon aux LT de l'hôte (rôle de CPA) (Marelli-Berg F.M. 2004). La présence d'infiltrat dans les tissus greffés au cours de l'AG est de ce fait un des reflets de cette activation endothéliale. La production des cytokines pro-inflammatoires par les neutrophiles, les macrophages et les LT infiltrant le greffon permet alors de maintenir les CE dans leur phénotype activé.

L'induction et la surexpression de chimiokines et des molécules d'adhérence par les CE pourrait également être un des mécanismes à l'origine du recrutement de progéniteurs endothéliaux et

musculaires lisses impliqués dans l'hyperplasie néo-intimale (cf partie définition AG). En effet, l'inactivation du récepteur des chimiokines CCL5 et CCL2 (CCR1) dans les CML réduit l'AG (Gao W. 2000). Même si ce résultat ne permet pas de distinguer si ce récepteur participe au recrutement de progéniteurs de CML circulants ou des CML de la média, il permet toutefois de proposer un mécanisme par lequel les 2 types de CML sont attirés dans la néo-intima au cours de l'artériosclérose.

Tout comme l'inflammation elle-même, l'activation endothéliale qui en résulte est donc un élément majeur de l'AG. De plus, dans ces formes chroniques, l'activation endothéliale par le TNF ou/et l'IFN γ aboutit à la mort de CE. Les lésions endothéliales qui en résultent sont également supposées jouer un rôle majeur dans l'AG.

5. Apoptose et Remodelage Vasculaire

L'endothélium en transplantation est la première couche cellulaire présentée aux cellules immunitaires du receveur. En même temps que les CE, activées par l'inflammation notamment, favorise les réactions immunes dirigées contre le greffon, elles sont également les premières cibles des épisodes de rejet. Au cours de l'AG toutefois, l'endothélium n'est cependant pas massivement lésé grâce aux molécules de survie (ex. A20, Bcl₂, Bcl-x_L, HO-1) exprimées par les CE et responsables de leur résistance à l'apoptose (Ferran C. 2006).

Toutefois, les conditions hypoxiques, inflammatoires et cytotoxiques subies par les CE au moment de la greffe lors de l'ischémie/reperfusion et en réponse aux épisodes de rejets, induisent tout de même la mort de CE au niveau du greffon (Dong C. 1996; Choy J.C. 2004). En transplantation humaine, l'apoptose des CE a été décrite dans les artères coronaires de greffons cardiaques dans les phases précoces de l'AG (Dong C. 1996). Dans un modèle expérimental de greffe entre 2 souris présentant des différences mineures de CMH, l'apoptose endothéliale a également été observée dans les premières phases de développement de l'AG (Choy J.C. 2004). Dans le cadre de transplantations rénales, dans un modèle de rejet aigu donnant lieu à de l'AG chez le miniporc, l'importance de l'apoptose des CE après la greffe est corrélée à la survenue plus tardive du remodelage vasculaire de l'artériosclérose (Shimizu A. 2002; Shimizu A. 2002). Les phases précoces de rejets de ce modèle sont caractérisées par une accumulation importante de macrophages et de lymphocytes au niveau des capillaires glomérulaires et péri-tubulaires associée à un nombre élevé de CE apoptotiques. Alors que la moitié des animaux récupèrent après cette phase aiguë de rejet, l'autre moitié présentant toujours cet infiltrat et ces CE apoptotiques développent de l'artériosclérose. L'induction d'apoptose par le système immunitaire du receveur a été alors proposée par les auteurs comme un élément déterminant dans la pathogénie de l'AG. Dans la plupart de ces études, il apparaît que les lésions endothéliales générées par la mort des CE précèdent le développement de l'hyperplasie néo-intimale.

L'apoptose cellulaire es régulée par 2 voies : la voie intrinsèque (dépendante des mitochondries) ou/et extrinsèque (dépendant des récepteurs de mort) (Figure 15). La première est activée par des facteurs immuns (facteur C5a du complément) et non immuns (hypoxie et stress oxydatif). La voie extrinsèque est activée dans les CE par les interactions Fas/FasL (Cailhier J.F. 2006). FasL est présenté par les LT CD8 cytotoxiques qui induisent ainsi l'apoptose des CE qui expriment le récepteur Fas à leur surface. Ce mécanisme a été mis en évidence notamment dans les phases précoces du rejet de greffe (Nagata S. 1999). Le blocage de cette voie de mort permet également de prévenir les lésions immunes des CE et la prolifération des cellules vasculaires qui en découle (Wang T. 2002). Ces lymphocytes CD8 cytotoxiques libèrent également par exocytose la perforine et le granzyme B. La première de ces molécules perce la membrane cytoplasmique permettant ainsi l'entrée de granzyme B. Cette sérine protéinase induit alors directement l'activation de caspases initiatrices (caspase-8 et -9), effectrices (caspase-3 et -6) et la voie dépendante des mitochondries par la protéolyse de Bid (tBid) (Heibei J.A. 2000). *In vivo*, chez la souris, l'inactivation de la perforine ou de granzyme réduit l'apoptose des CE et diminue également le remodelage vasculaire associé, sans pour autant affecté l'infiltrat du greffon par les LT CD8⁺ (Choy J.C. 2004; Choy J.C. 2005).

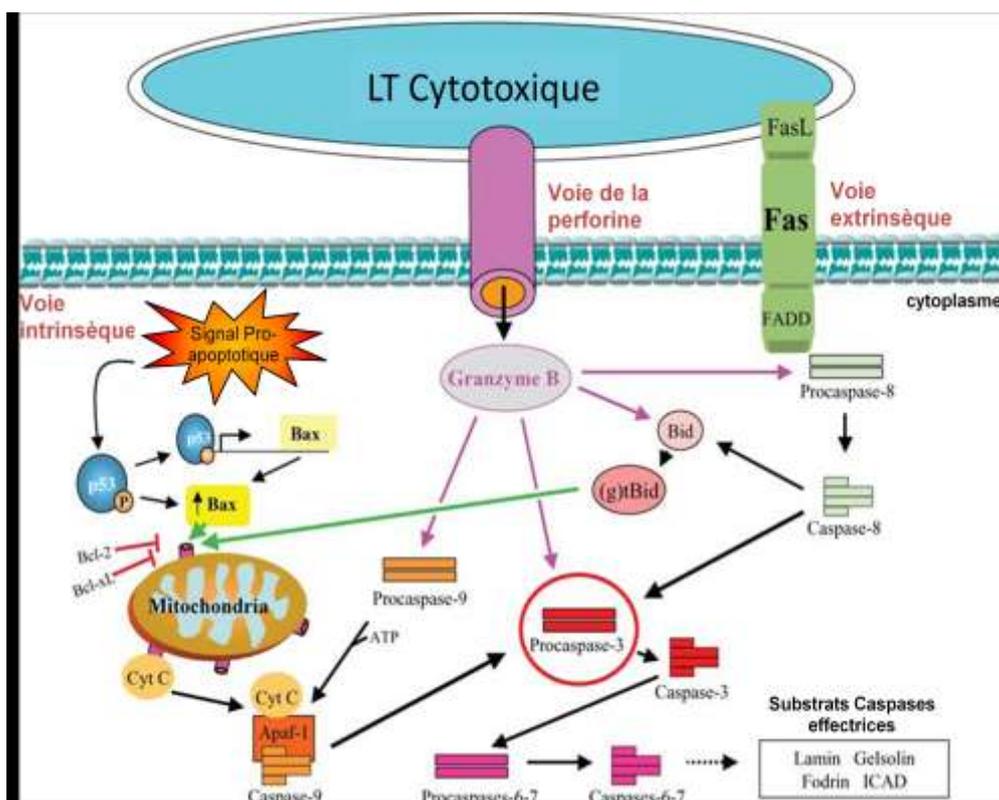


Figure 15. Voie intrinsèque, extrinsèque et de la perforine/granzyme B de l'apoptose dans les Cellules Endothéliales (D'après J.-F. Cailhier *et al*, 2006)

Les anticorps anti-CMH et anti-CE du donneur retrouvés dans le sérum d'animaux suffisent également pour induire l'apoptose des CE *in vitro* (Wu G.D. 2002; Le Bas-Bernardet S. 2003). Cette

toxicité est en partie dépendante de l'activation du complément qui peut induire l'apoptose ou la nécrose des cellules cibles (Bohana-Kashtan O. 2004).

Les lésions intimales précoces du greffon participent au développement de l'AG en favorisant là encore le recrutement et l'activation des monocytes/macrophages (Ross R. 1993). Pour ce faire, la membrane des corps apoptotiques renferment de forts taux de lipides oxydés qui vont induire l'expression de chimiokines (CCL2) et de molécules d'adhérence (ICAM1, VCAM1) par les CE voisines (Hebert M.J. 1998). Ces corps apoptotiques libèrent également de la lysophosphatidylcholine qui agit comme facteur chimio-attractant pour les monocytes (Huber J. 2002). Enfin, l'exposition de la membrane basale sous-endothéliale induit une coagulation locale en induisant la présentation et l'activité du FT (Bombeli T. 1999), également associé à l'AG (Holschermann H. 1999; Yen M.H. 2002). Ce processus permet certes la phagocytose et l'élimination de ces débris cellulaires mais les macrophages activés libèrent alors du FT, du TGF β et du PDGF qui jouent un rôle majeur dans l'AG en induisant la prolifération et la migration des CML dans l'intima (Li Z. 1994).

Des mécanismes de réparation de ces lésions sont alors mis en place. Il a été rapporté que durant l'AG, les CE de la néo-intima tout comme les CML peuvent dériver de cellules du receveur (Asahara T. 1997; Lin Y. 2000; Soler M.J. 2005). Ce chimérisme cellulaire est supposé être une conséquence des lésions endothéliales qui permettent le recrutement de progéniteurs endothéliaux circulants dérivés de la moëlle osseuse. Le taux de ces progéniteurs dans le sang a d'ailleurs été proposé comme un marqueur de l'apoptose endothéliale et de l'AG (Woywodt A. 2003; Chu K. 2008).

De plus, les cellules myo-fibroblastiques qui prolifèrent dans la néo-intima dérivent parfois de cellules endothéliales par le processus d'EMT (*Endothelial-to-Mesenchymal Transformation*) (Hillebrands J.L. 2003). Cette différenciation des CE qui perdent leur marqueurs spécifiques pour en acquérir des musculaires lisses fait également intervenir le TGF β libéré par les macrophages (Sales V.L. 2006). La combinaison apoptose endothéliale, macrophages, TGF β et progéniteurs circulants (CE et CML) pourrait ainsi fortement concourir à l'initiation et à la progression de l'AG.

Néanmoins, les mécanismes moléculaires à l'origine du contrôle de l'activation, de la dysfonction et surtout de la survie des CE dans ce contexte particulier de l'allogreffe sont encore mal caractérisés. Leur identification est donc aujourd'hui un enjeu majeur pour proposer de nouvelles stratégies thérapeutiques. Dans cette optique et de par ses fonctions dans le contrôle de la prolifération, de l'apoptose et de la différenciation cellulaire, nous avons décidé d'étudier le rôle de la voie de signalisation Notch dans l'homéostasie endothéliale et dans la pathogénie de l'AG.

La voie de signalisation Notch

I. Présentation générale

1. Historique

La voie de signalisation Notch est une voie très conservée au cours de l'évolution et retrouvée chez tous les métazoaires pour contrôler la différenciation cellulaire. Notch est impliqué dans de nombreux contextes cellulaires, aussi bien chez l'embryon que chez l'adulte, des organismes allant de l'oursin à l'Homme, en passant par les vers et les insectes. Cette ubiquité a d'ailleurs été à l'origine d'une forte augmentation du nombre d'études portant sur Notch durant ces 20 dernières années.

Pourtant, le gène codant pour le récepteur Notch a été découvert depuis presque 90 ans, en 1919, chez la drosophile où une perte de fonction partielle (haplo-insuffisance) de ce locus induit des entailles (« Notches ») au niveau de la marge des ailes (Mohr O.L. 1919). Notch a gagné sa notoriété en 1940, grâce aux travaux de Poulson qui montra par une étude embryonnaire classique la létalité de mutations induisant une perte de fonction complète de ce locus. Ces mutations provoquaient un phénotype « neurogénique », des cellules destinées à devenir de l'épiderme se différenciant en tissu neural. Le gène *Notch* a finalement été caractérisé, d'abord chez *Drosophila Melanogaster* puis retrouvé et très étudié chez *C. Elegans* (Greenwald I. 1998), les oursins et de nombreux vertébrés, dont l'Homme (Gridley T. 1997; Sherwood D.R. 1997). De nombreuses études génétiques et moléculaires ont permis l'identification de nombreux partenaires pouvant participer dans la transmission du signal médié par le récepteur Notch (figure 20). Parmi eux, chez la Drosophile, les membres des familles Delta et Serrate ont été identifiés comme des ligands de Notch.

2. Structure

Chez les mammifères, 4 récepteurs ont été identifiés, Notch1-4 associés aux ligands DSL (Delta and Serrate ligands) : Delta-like1,-3,-4 (Dll) et Jagged1,-2 (Jag).

a) Structure type des récepteurs Notch

Au niveau moléculaire, les récepteurs Notch sont des protéines transmembranaires de type I, composées d'un fragment extracellulaire (NECD) et d'un fragment transmembranaire (NTM) (Aster J.C. 2008). Le fragment extracellulaire est constitué de motifs de type EGF (*Epidermal Growth Factor-Like* ; EGFL), de motifs LNR (*LIN12/NOTCH repeats*) et d'un domaine d'hétéro-dimérisation juxta-membranaire. Ce domaine associé aux motifs LNR semble constituer une région régulatrice négative (NRR) spécifique aux récepteurs Notch.

Le fragment NTM est composé d'un court domaine extracellulaire, d'un domaine transmembranaire unique et d'un domaine intracellulaire (NICD). Le NICD est composé d'un domaine RAM, de deux domaines de localisation nucléaire (NLS), de domaines ankyrine répétés (ANK), d'un domaine d'activation transcriptionnelle et d'une région PEST (Pro-Glu-Ser-Thr) qui pourrait intervenir dans le processus de sa dégradation par ubiquitination (Greenwald I. 1998; Artavanis-Tsakonas S. 1999). Les récepteurs Notch1,-2 et -3 des mammifères ont également une région de réponse aux cytokines (NCR).

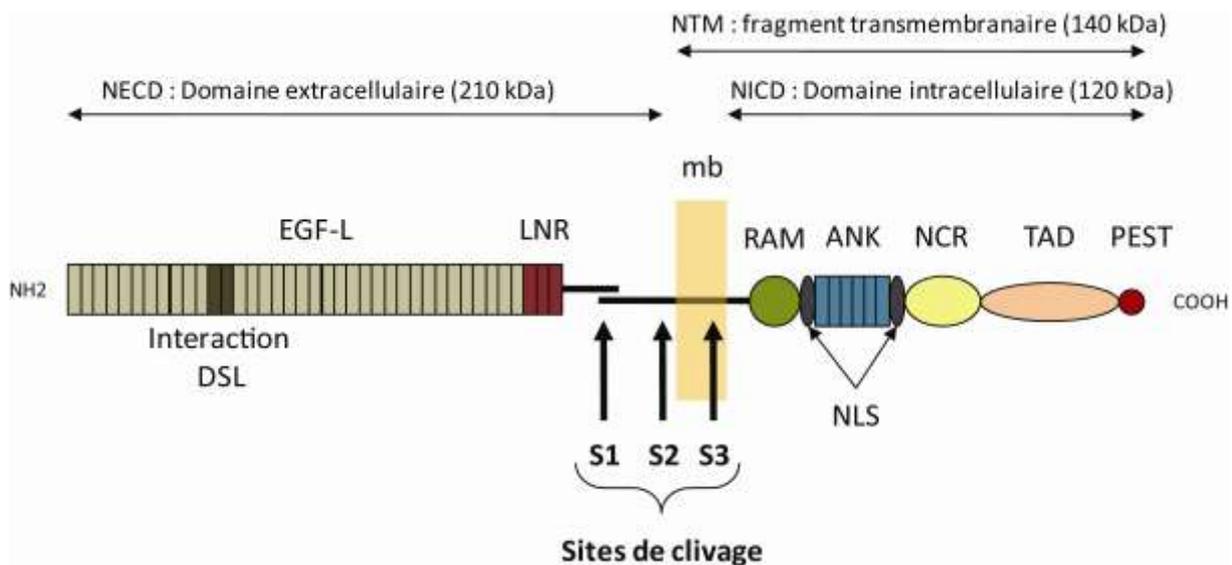


Figure 16. Structure-type des Récepteurs Notch

b) Structure des récepteurs Notch

La voie Notch a été bien conservée au cours de l'évolution et, de plus, elle a subi plusieurs amplifications, si bien que plusieurs orthologues ont été identifiés pour chacun de ses gènes. Le plus fort degré d'homologie entre les récepteurs Notch se trouve au niveau des domaines ANK alors que la partie C-terminale montre la plus forte variabilité. Ainsi, les récepteurs Notch1 -2 et -3 des mammifères ont également une région de réponse aux cytokines (NCR) qui régule leur activité fonctionnelle et un domaine TAD (*Transcriptional Activation Domain*). Chez la drosophile, la protéine Notch contient 36 motifs de type EGF, suivis de 3 motifs LNR, un domaine transmembranaire, une région RAM, 7 domaines ANK (Lubman O.Y. 2004), une région NLS et un domaine intracellulaire avec une région PEST (Egan S.E. 1998). Chez *C. elegans* les récepteurs appelés LIN-12 et GLP-1 ont des structures similaires mais seulement avec 13 et 10 domaines de type EGF respectivement. Chez les mammifères, Notch1 et Notch2 ont 36 domaines EGF, alors que Notch3 et Notch4 en ont 34 et 24, respectivement.

c) Structure des ligands de la famille Delta et Serrate

Les ligands de ces récepteurs sont également bien conservés. Chez la drosophile, les ligands de Notch sont codés par les gènes *Delta* et *Serrate*. La partie extracellulaire du ligand Delta contient un domaine DSL suivi de 9 motifs de type EGF. Chez les mammifères, 3 variants du gène Delta ont été décrits, delta-like 1, 3 et 4 (DII1, DII3 et DII4) qui contiennent chacun un domaine DSL et 8, 6 et 8 domaines de type EGF respectivement (Figure 17).

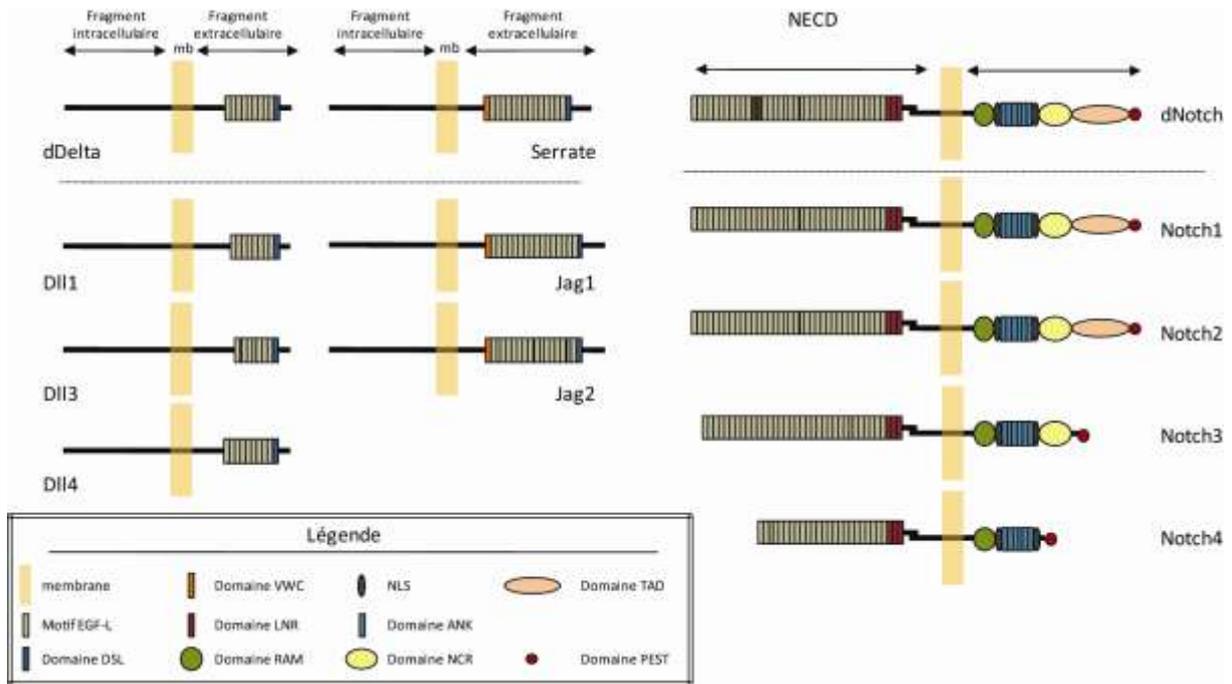


Figure 17. Différences structurales des Récepteurs et Ligands de la voie Notch

Il existe un quatrième ligand chez les mammifères, structurellement proche des gènes de la famille Delta, appelé Pref1 ou Dlk qui diffère des autres ligands Dll par le manque le domaine DSL (nécessaire à l'interaction avec le récepteur) et une portion intracellulaire plus courte (Figure 18). En raison de ces observations, il est probable que ce ligand ne puisse directement activer Notch mais plutôt jouer le rôle d'antagoniste vis-à-vis des récepteurs (Bray S.J. 2008).

Le deuxième ligand de Notch est appelé Serrate chez la Drosophile et Jagged1 et Jagged2 chez les mammifères (Lissemore J.L. 1999). Ce sont également des protéines transmembranaires. Leur fragment extracellulaire est composé d'un domaine DSL et de 14 motifs de type EGF pour serrate et 16 pour Jagged1 et Jagged2, ainsi que d'un troisième domaine impliqué probablement dans les processus de dimérisation (domaine de von Willebrand de type C ; VWR). Les séquences N- et C-terminales des gènes de la famille *Delta* et *Serrate* sont moins conservées mais toutes deux contiennent un domaine riche en cystéines dans la partie N-terminale, probablement impliqué dans la spécificité des liaisons ligand-récepteur.

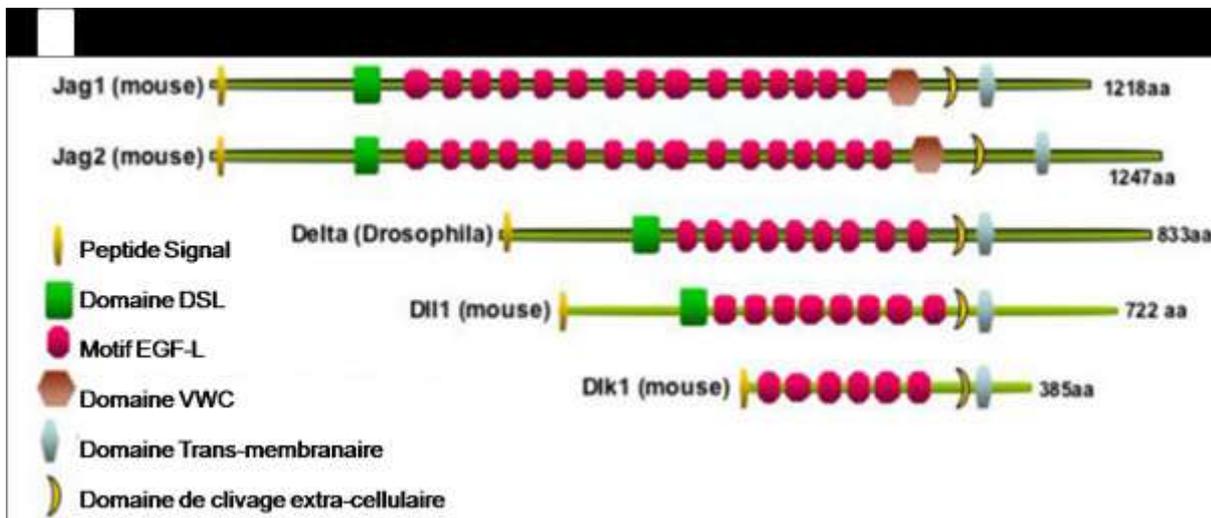


Figure 18. Structure du ligand Dlk1 (D'après Sarah J Bray et al, 2008)

Enfin, la F3/Contactine a été décrite comme un ligand potentiel de la voie. Présente sur les axones, elle active la voie Notch/Deltex dans les oligodendrocytes (Hu Q.D. 2003).

Cette multiplication de gènes a pour corollaire une augmentation de la complexité de la fonction Notch de telle sorte qu'à l'heure actuelle, ses modes de fonctionnement ne sont que grossièrement connus.

II. Activation de la voie de signalisation Notch

Le récepteur Notch est synthétisé sous forme d'un précurseur de 300 kDa, qui est clivé constitutivement dans le système *trans* de l'appareil de Golgi par une convertase de type furine (S1) (Figure 20) (Blaumueller C.M. 1997; Logeat F. 1998). Ce clivage conduit à la formation de deux sous-unités NECD et NTM qui restent associées de manière non-covalente et calcium-dépendante sous forme d'hétérodimères. L'hétérodimère est adressé à la surface cellulaire où il reste inactif jusqu'à ce qu'il se lie à un de ses ligands présents à la surface d'une cellule contiguë. L'interaction avec le ligand associé à une *trans*-endocytose du complexe NECD-ligand permet une modification conformationnelle du récepteur libérant le site S2 de protéolyse aux protéines dysintégrines et métalloprotéinases ADAM10 (Kuzbanian) et ADAM17 (TACE pour TNF converting Enzyme). Ce deuxième clivage (S2) est ensuite rapidement suivi par le clivage S3 opéré dans le domaine transmembranaire du récepteur par le complexe γ -sécrétase composé de préséniline, nicastrine, PEN2 et APH1 (Mumm J.S. 2000; Fortini M.E. 2002). Le NICD ainsi libéré dans le cytoplasme est finalement acheminé dans le noyau grâce aux séquences NLS qu'il comporte. Dans le noyau, le NICD interagit avec CSL (CBF1, Su(H) et Lag-1). CSL est une protéine qui est liée à l'ADN et qui, en l'absence de NICD, est lié aux protéines SMRT, SHARP (aussi connu sous le nom de MINT et SPEN) et CtBP (Figure 19). Ce complexe, par le recrutement d'histone deacetylase (HDAC) et d'autres cofacteurs (SIN3A, CIR) (Kao H.Y. 1998; Hsieh J.J. 1999; Zhou S. 2000; Oswald F. 2005) réprime la

transcription des gènes cibles. L'activation de la voie Notch, par la libération et la fixation du NICD sur CSL par son domaine RAM permet le désassemblage de ce complexe, puis le recrutement de Mastermind (Mam) induit la transcription des gènes-cibles de la voie. Par un mécanisme de rétro-contrôle négatif, l'assemblage du complexe co-activateur induit également la dégradation du NICD lui conférant ainsi une courte demi-vie : par recrutement de la cyclin-dépendent kinase-8 (CDK8) qui le phosphoryle, NICD devient le substrat de l'ubiquitine ligase nucléaire SEL10 pour être finalement dégradé par le protéasome (Fryer C.J. 2004). Ainsi, l'expression d'un dominant négatif de SEL10 conduit à une sur-expression des gènes-effecteurs de Notch (Wu G. 2001). L'interaction NICD-SEL10 nécessite la région C-terminale PEST, en adéquation avec les études sur des formes tronquées de NICD en C-terminal qui se comportent comme des mutations activatrices de la voie et contribuent au développement de tumeurs chez l'Homme (Weng A.P. 2004).

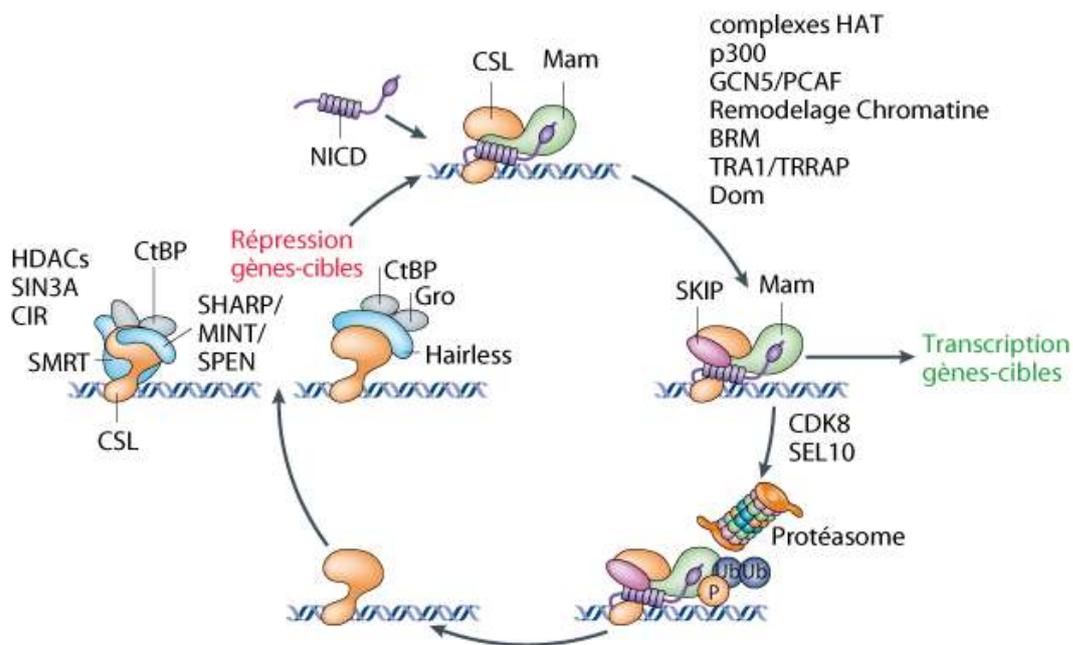


Figure 19. Mécanismes et partenaires de NICD pour permettre l'induction de la transcription des gènes-cibles de Notch
D'après Sarah J Bray *et al*, 2006

Les principaux gènes cibles décrits à ce jour sont les facteurs de transcription de la famille Hes et Hey (Hrt, Hes-related genes, Hesr, Herp ou Chf). Ces molécules codent des protéines de type bHLH (*basic helix-loop-helix*) et constituent une famille de répresseurs de transcription dont les spécificités et combinaisons complexes suggèrent une régulation fine et sélective de nombreux gènes-cibles (Iso T. 2003).

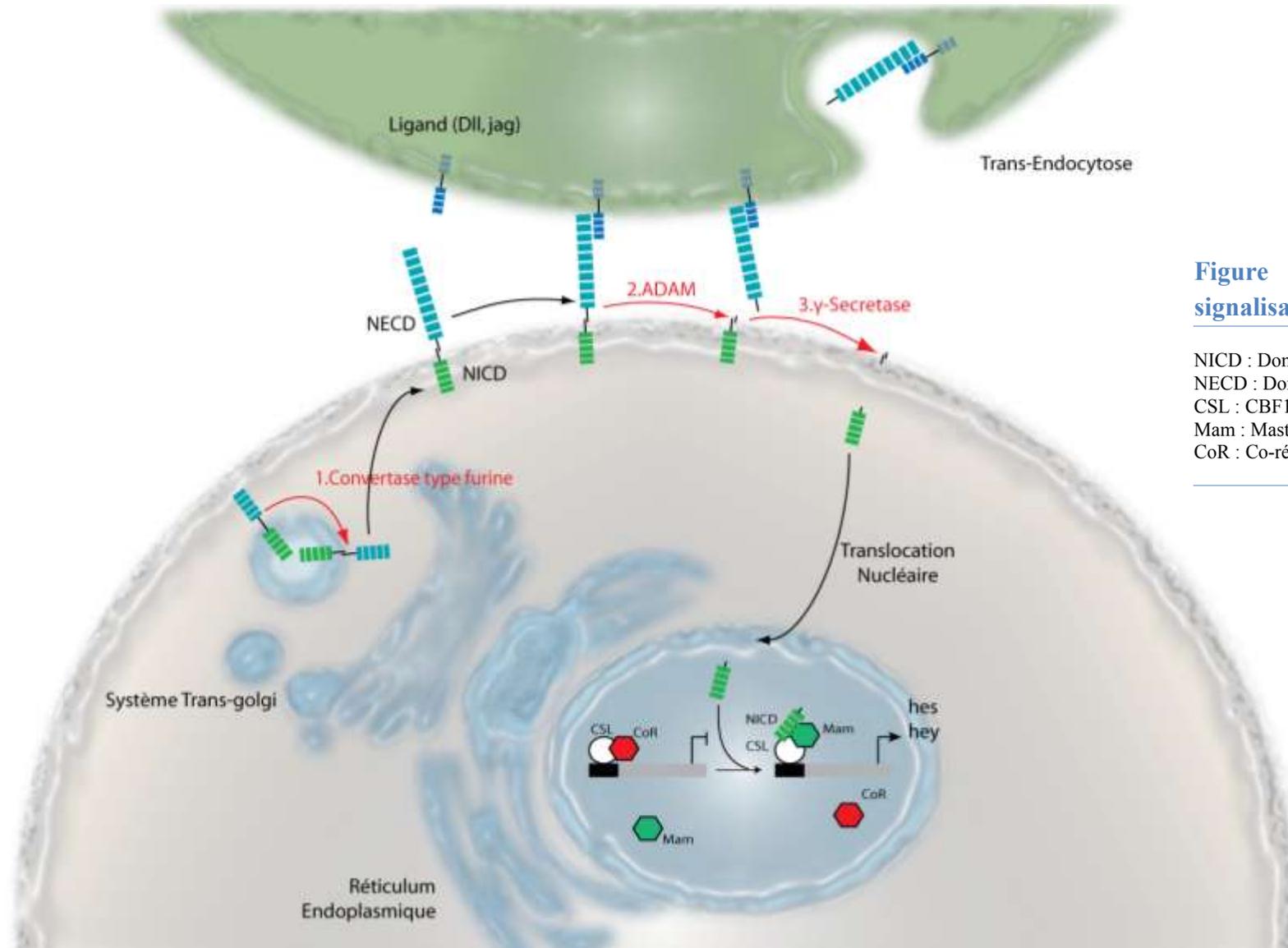


Figure 20. Activation de la voie de signalisation Notch

NICD : Domaine intracellulaire de Notch
 NECD : Domaine extracellulaire de Notch
 CSL : CBF1-Su(H)-Lag1
 Mam : Mastermind
 CoR : Co-répresseurs

III. Principaux régulateurs de la voie Notch

1. O-Fucosyltransferase-1 (O-FucT-1 ou Ofut1) et Fringe

La maturation du récepteur Notch au niveau du golgi ne se limite pas au clivage S1 par la convertase qui permet la constitution de l'hétérodimère NECD-NTM. La glycosylation et plus précisément la O-fucosylation par Ofut1 de segments EGF est un élément essentiel à l'activation de la voie Notch. Ainsi, chez la souris, une mutation du gène correspondant *Pofut1* résulte en une létalité embryonnaire associée à des défauts de somitogenèse, cardiogenèse, vasculogenèse et neurogenèse (Shi S. 2003). Ce phénotype ressemble à celui développé par les souris mutantes pour CSL (Oka C. 1995), ou par les souris double mutantes pour les 2 gènes codant pour la preseniline (Donoviel D.B. 1999).

Les séquences répétées EGF sont également la cible de Fringe, une seconde glycosyltransferase qui permet chez la drosophile de potentialiser l'activation des récepteurs Notch par le ligand Delta tout en inhibant la capacité de Serrate à activer Notch. (Bruckner K. 2000; Moloney D.J. 2000).

Comme suggéré par ces derniers résultats, ces modifications sont aujourd'hui supposées réguler la reconnaissance des récepteurs avec leurs ligands en modifiant la conformation spatiale du NECD ou bien en générant des sites de fixation pour des cofacteurs tels que les lectines, qui pourraient alors moduler les interactions Récepteurs-Ligands (Haines N. 2003).

2. Neuralized (Neur) et Mind Bomb (Mib)

Neur et Mib sont deux protéines de type RING Finger E3 Ubiquitine ligase qui ont pour rôle d'ubiquitinyler les ligands Dll et Jagged pour induire leur endocytose. Leur impact sur l'activité de Notch est encore controversé. En effet, l'endocytose des ligands induit une diminution de l'exposition de ces protéines aux récepteurs Notch alors que cette ubiquitinylation est nécessaire à une activation efficace des récepteurs, probablement en facilitant la trans-endocytose du complexe NECD-ligand et ainsi permettre le clivage S2 de Notch ou en permettant une maturation post-traductionnelle des ligands (Parks A.L. 2000; Itoh M. 2003).

3. Epsine, Auxiline

L'epsine et l'auxiline sont 2 protéines qui jouent un rôle clé dans la régulation de l'endocytose et sont nécessaires pour l'activation de Notch. Les rôles respectifs de ces protéines, l'une interagissant avec l'ubiquitine et l'autre permettant l'endocytose par désassemblage des réseaux de clathrine,

suggéreraient une collaboration avec Mib et Neur pour permettre l'endocytose des ligands lors de l'activation de la voie (Overstreet E. 2004; Wang W. 2004).

4. Numb et Deltex

Numb est un inhibiteur cytoplasmique des récepteurs Notch par un mécanisme encore mal caractérisé mais qui fait également intervenir l'endocytose (Berdnik D. 2002; Langevin J. 2005). Deltex est une protéine RING Finger E3 que présente quant à elle un rôle activateur de la voie Notch et participe à l'induction de la transcription des gènes-cibles de la voie Notch (Matsuno K. 1998; Yamamoto N. 2001).

IV. Activation indépendante de CSL

La séquence d'évènements décrite ci-dessus décrit la voie classique d'activation de Notch encore appelée la voie canonique dépendante de CSL. Néanmoins, de nombreuses expériences indiquent l'existence d'une voie alternative, indépendante de CSL. Les arguments principaux étayant cette hypothèse sont issus d'expérimentations génétiques sur la drosophile et d'études sur la différenciation de cellules de mammifères.

- En particulier, l'analyse des phénotypes des embryons présentant des mutations de Notch et de CSL chez la drosophile montre que le phénotype des embryons muté pour Notch est légèrement plus marqué que chez les mutants de CSL, suggérant ainsi que toutes les fonctions de Notch ne passent pas par CSL (Rusconi J.C. 1998; Zecchini V. 1999).

- De plus, une série de techniques de reconstitutions génétiques pour des mutants de Notch montrent qu'une stratégie de compensation génétique avec Su(H) ne permet pas de bloquer le développement des progéniteurs musculaires ou le développement neuronal chez la Drosophile (Brennan K. 1999; Romain P. 2001).

- Différentes régions du récepteur Notch semblent assurer des fonctions spécifiques, particulièrement la région entre les répétitions EGF 23 à 26 et au niveau des répétitions ankyrine (Axelrod J.D. 1996; Brennan K. 1999).

- Dans des tests de différenciation de cellules mammifères C2C12, des formes tronquées de NICD (qui ne peuvent pas activer de promoteur dépendant de CSL) montrent une activité même en présence d'un dominant négatif de CSL (Shawber C. 1996; Nofziger D. 1999).

- Dans les cellules gliales de Bergmann, une voie dépendante de deltex mais indépendante de CSL a récemment été identifiée (Eiraku M. 2005).

- Dans les CE, la surexpression de Notch4 protège de l'apoptose par un mécanisme indépendant de CSL (MacKenzie F. 2004).

V. Activation des ligands de la voie Notch : signal bidirectionnel ?

De récentes études suggèrent que l'activation de la voie Notch n'est pas unidirectionnelle mais que les ligands, tout comme les récepteurs, peuvent aussi être clivés. Plus particulièrement, il a été montré que Dll1 pouvait être clivé par ADAM10. De plus, le domaine intracellulaire de Dll1 (Dll1ICD) ainsi libéré peut également être détecté dans les noyaux des cellules dites « émettrices » (qui portent les ligands). Ce type de clivage protéolytique et cette localisation nucléaire similaire au schéma d'activation des récepteurs Notch ont été retrouvés par plusieurs groupes (Qi H. 1999; Six E. 2003). Toutefois, la signification biologique et les fonctions de ces LigandsICD restent inconnues.

Fonctions Générales de la voie Notch

I. Différenciation cellulaire

Le rôle initialement décrit pour la voie de signalisation Notch est la régulation de la différenciation cellulaire au cours de l'organogenèse. Notch est en effet fortement impliqué dans le développement de tissus dérivés des 3 feuillets primaires : l'endoderme (ex. le pancréas (Lammert E. 2000)), le mésoderme (ex. le système hématopoïétique (Milner L.A. 1999), les glandes mammaires (Callahan R. 2004), l'appareil vasculaire (Karsan A. 2005)) et l'ectoderme (ex. le système nerveux (Yoon K. 2005)). De plus, Notch contrôle le développement et la maturation de tissus et de cellules chez l'adulte (ex le contrôle de la différenciation de nombreuses lignées hématopoïétiques) (Artavanis-Tsakonas S. 1999). Notch est ainsi un élément déterminant aussi bien pour maintenir une cellule dans un état différencié que pour induire la différenciation. 3 modèles ont été proposés pour illustrer cette fonction (Figure21).

1. Inhibition latérale

Le système Notch/ligand permet d'amplifier les différences d'expression des récepteurs et ligands Notch entre 2 cellules initialement semblables pour induire l'activation de Notch dans la cellule dite « réceptrice » et maintenir la cellule voisine « émettrice » soit dans un état non-différencié soit dans une autre voie de différenciation. Par exemple, durant la neurogenèse chez la Drosophile, au sein d'un cluster de cellules non différenciées exprimant similairement ligands et récepteurs Notch, l'une d'entre elle va présenter une augmentation de l'expression du ligand Delta activant davantage le récepteur Notch des cellules voisines. Cette activation de Notch va alors induire une inhibition de l'expression de ce ligand alors que l'expression du récepteur Notch va être inhibée dans la cellule où Delta est surexprimé, amplifiant le déséquilibre ligand/récepteur initial. Dès lors, les cellules réceptrices où le récepteur est activé restent dans un état indifférencié alors que la cellule émettrice se différencie en cellule neurale (Chitnis A.B. 1995; Henrique D. 1997).

Les mécanismes permettant d'amplifier les différences d'expression de Notch et de ses ligands sont des boucles de rétrocontrôle par l'expression de régulateurs de la voie (ex. membres de la famille *beared*, *snail*-*tom*-*neuralized*) (Bardin A.J. 2006; De Renzis S. 2006) ou par la répression (par *Hes/Hey*) de gènes de différenciation et/ou des gènes Notch (Castro B. 2005; Neves A. 2005). Toutefois, l'évènement initiateur des modifications d'expression et d'activité Notch à l'origine de cette inhibition latérale reste indéterminé.

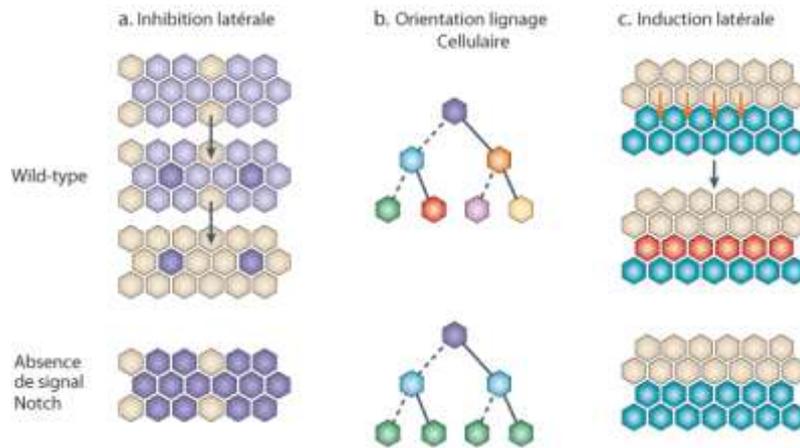


Figure 21. Mécanismes de contrôle de la différenciation cellulaire par la voie Notch
(D'après Nicola Haines et Kenneth D. Irvine, 2003)

2. Orientation lignage cellulaire

La voie de signalisation Notch dans 2 cellules-filles issues d'un même progéniteur est dépendante de la répartition asymétrique du contenu cytoplasmique en régulateurs de Notch (par exemple Numb). Dès lors, l'activation de Notch est différente dans chaque cellule-fille induisant des orientations distinctes de différenciation.

3. Induction Latérale

L'activation de la voie Notch est induite entre 2 populations de cellules pour induire la différenciation au niveau de l'interface cellulaire.

II. La prolifération et l'apoptose : rôle controversé de Notch dans le développement de tumeurs

La voie de signalisation Notch est également fortement impliquée dans le contrôle de la prolifération et l'apoptose de nombreux types cellulaires, faisant l'objet de nombreuses études dans le cadre de l'oncogenèse. Historiquement, Notch a été identifié chez l'Homme par la translocation chromosomique du domaine actif de Notch à proximité du locus de la chaîne beta du TCR (*T cell receptor*) chez des patients atteints d'une leucémie aigüe lymphoblastique de type T (T-ALL). Cette translocation $t(7;9)(q34;q34.3)$ provoque chez ces patients une expression constitutive aberrante du NICD de Notch1 appelé TAN1 pour *Translocation-associated Notch1*. Elle est retrouvée dans moins de 1% des T-ALL mais des mutations activatrices de Notch1 indépendantes de $t(7;9)$ est présente dans plus de 50% des cas de T-ALL chez l'Homme (Ellisen L.W. 1991). Il faut également noter que

des mutations activatrices de Notch2 et Notch3 sont également à l'origine de développement de T-ALL (Capobianco A.J. 1997; Bellavia D. 2002). Le développement de ce lymphome T a pour origine à la fois une orientation aberrante de la différenciation des progéniteurs hématopoïétiques en lymphocyte T (pour laquelle Notch1 joue un rôle crucial (Maillard I. 2003)), l'inhibition de l'apoptose et une prolifération incontrôlée de ces cellules (Figure 22 & 23).

Dans les lymphocytes T, N1ICD protège de l'apoptose médiée par le TCR en inhibant l'activité de la protéine pro-apoptotique Nur77 (Jehn B.M. 1999). Dans d'autres modèles d'apoptose (dexaméthasone, étoposide ou Fas), la survie des cellules T est assurée en sur-exprimant les molécules protectrices de la famille des inhibiteurs de l'apoptose (IAP), de Bcl2 et de FLIP (*FLICE-like inhibitor protein*) (Deftos M.L. 1998; Sade H. 2004). De plus, à l'interface apoptose/prolifération, l'activation de Notch1/3 bloque la fixation à l'ADN et l'activité transcriptionnelle d'E2A (répresseur de la transcription de la famille HLH), induisant la survie et la multiplication cellulaire (Ordentlich P. 1998; Talora C. 2003). Enfin, il a également été rapporté que N1ICD pouvait inhiber la protéine pro-apoptotique p53 en bloquant sa phosphorylation et sa localisation nucléaire par un mécanisme PI₃K-Akt et mTOR dépendant (Mungamuri S.K. 2006). Au niveau de la machinerie du cycle cellulaire, Notch1 activé permet la dégradation de p21^{cip1} et p27^{kip1} par l'intermédiaire de SKP2 et ainsi de favoriser la transition G1-S du cycle cellulaire des cellules fibroblastiques 3T3 (Sarmiento L.M. 2005).

En outre des T-ALL, d'importantes régulations de Notch ont été identifiées dans des lymphomes d'Hodgkin dérivés de cellules B, en particulier une surexpression de Notch1 et de jag1. La présence de Jag1 dans les cellules voisines des cellules cancéreuses où Notch1 est anormalement activé suggère le rôle inducteur de ce ligand et de ce récepteur dans le développement de cette pathologie.

Enfin, des expressions anormales des membres de la voie Notch ont été décrites dans des cellules primaires de myélome multiple tout comme dans de nombreuses tumeurs solides (pancréas, prostate, col de l'utérus, cerveau, colon, poumon, peau, sein (Zagouras P. 1995; Gray G.E. 1999; Miyamoto Y. 2003; Nickoloff B.J. 2003; Santagata S. 2004; Cuevas I.C. 2005; Purow B.W. 2005)). Dans ces derniers cas, les mécanismes anti-apoptotiques font intervenir une induction de Bcl2 et des voies PI₃K et NFκB, combinée à une inhibition de la fonction de JIP1 (*JNK-interacting protein 1*) et donc de la

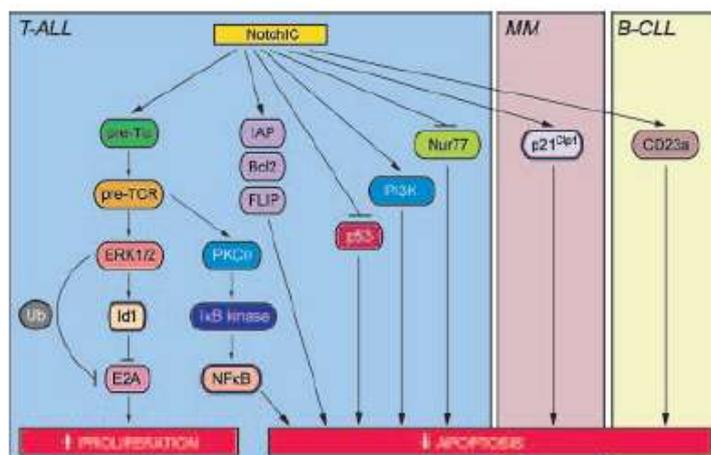


Figure 22. Fonctions oncogéniques de Notch dans les cancers hématologiques

(D'après Kevin G. Leong et Aly Karsan, 2006)

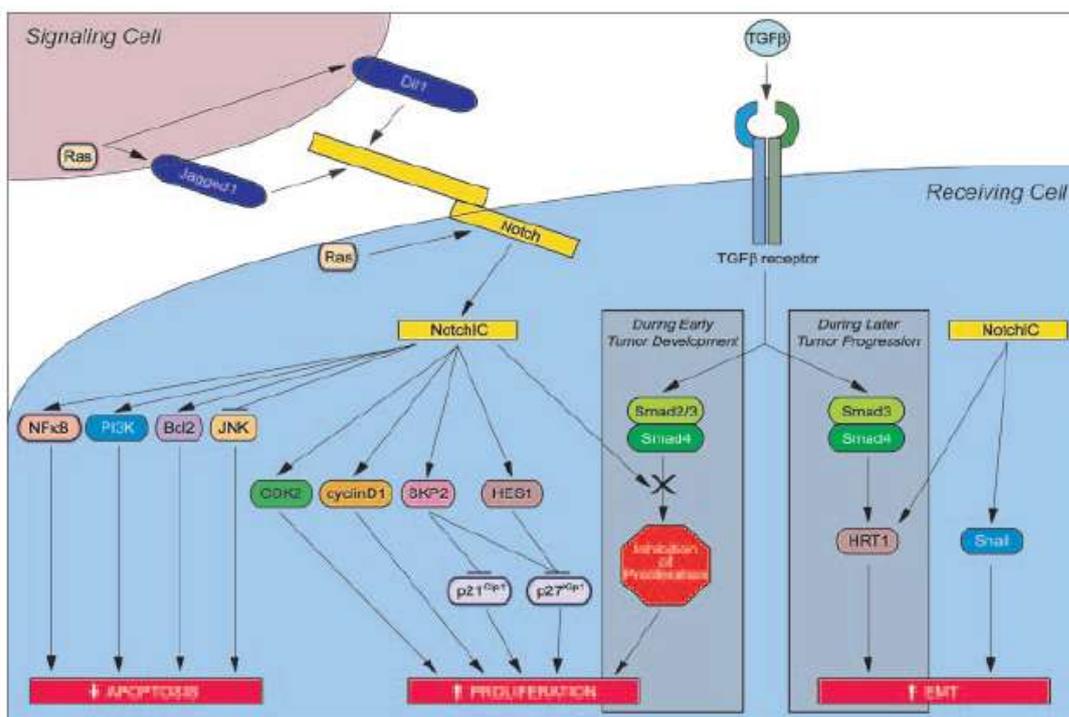


Figure 23. Fonctions oncogéniques de Notch dans les tumeurs solides (D'après Kevin G. Leong et Aly Karsan, 2006)

voie *c-Jun N-terminal kinase* JNK (Kim J.W. 2005).

L'ensemble de ces données indique donc le potentiel oncogène des récepteurs Notch. Néanmoins, de nombreuses études proposent également un rôle pro-apoptotique et anti-prolifératif de ces mêmes récepteurs, faisant de *Notch* des oncogènes tout comme des gènes suppresseurs de tumeurs.

Dans 4 études différentes, l'activation constitutive de Notch induit le blocage de la prolifération et l'induction d'apoptose dans les cellules B malignes. Dans ces cellules B, les 4 récepteurs montrent cet effet (Morimura T. 2000; Romer S. 2003; Nefedova Y. 2004; Zweidler-McKay P.A. 2005). Plus particulièrement, N1ICD est également capable de jouer ce rôle dans les cellules du lymphome d'Hodgkin et du myélome multiple (Zweidler-McKay P.A. 2005).

Dans les tumeurs solides du col de l'utérus, Notch1 est surexprimé au stade précoce de l'oncogenèse alors que durant les stades plus tardifs, les cellules cancéreuses expriment des niveaux réduits de Notch1. Les auteurs suggèrent un rôle bi-phasique de Notch1, favorisant le développement précoce de la tumeur tout en ayant une fonction anti-tumorale quand la tumeur est formée et organisée (Talora C. 2002).

Un rôle suppresseur de tumeur de Notch1 a également été démontré dans le cancer de la peau chez la souris. L'inactivation de ce récepteur dans la peau provoque une hyper-prolifération des cellules de

l'épiderme et conduit au développement d'une tumeur (Nicolas M. 2003). Des données plus récentes suggèrent un rôle similaire chez l'Homme (Thelu J. 2002). Dans l'épiderme, Notch1 est activé et contrôle la différenciation des kératinocytes. Les carcinomes humains montrent par contre une absence de N1ICD (Nickoloff B.J. 2003). Un rôle suppresseur similaire a été retrouvé dans les tumeurs de la prostate, du poumon, du cerveau et du foie (Shou J. 2001; Sriuranpong V. 2001; Fan X. 2004; Croquelois A. 2005).

Les mécanismes moléculaires responsables de ces effets sont peu caractérisés. Il a toutefois été montré dans les cellules cancéreuses du poumon que Notch1 et Notch2 induisaient une sur-expression de p21^{cip1} et p27^{kip1} et donc un arrêt du cycle cellulaire, à l'inverse de l'effet précédemment décrit dans les cellules 3T3. Notch1 activé induit p21^{cip1} également dans les kératinocytes primaires murins (Rangarajan A. 2001). Dans ces mêmes cellules, Notch1 bloque la signalisation de la β -caténine dépendante de l'activation de Wnt, et dont de récents travaux montrent un lien direct avec p21^{cip1} (Nicolas M. 2003).

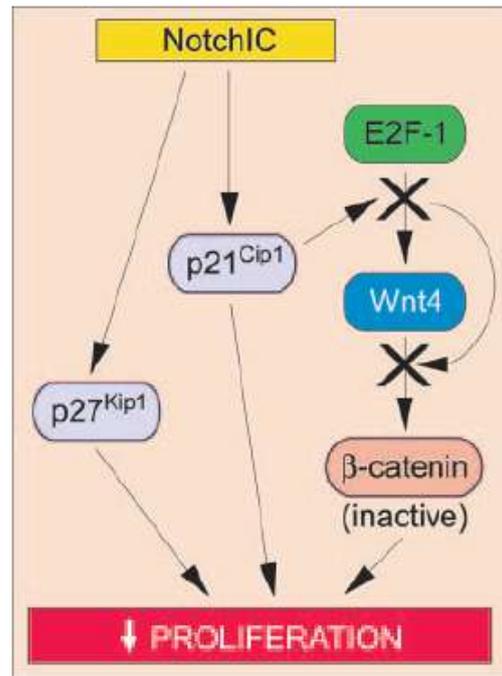


Figure 24. Fonctions anti-tumorales de Notch dans les tumeurs solides
(D'après Kevin G. Leong et Aly Karsan, 2006)

L'ensemble de ces travaux traduit la complexité fonctionnelle de la voie Notch avec des implications spécifiques de récepteurs dans certains contextes biologiques et pathologiques, ainsi que des rôles opposés pour les mêmes récepteurs en fonction du type cellulaire étudié. Des études restreintes à un cadre cellulaire et biologique donné semblent donc nécessaires pour identifier les rôles respectifs sur la survie et la prolifération des différents récepteurs Notch.

III. Fonctions croisées entre Notch et autres grandes voies de signalisation

La voie de signalisation Notch interfère avec de nombreuses autres voies majeures de la signalisation. Les principales et les plus étudiées sont les voies du VEGF, du TGF β /BMP et de NF κ B. Les interactions entre VEGF et Notch sont aujourd'hui relativement bien caractérisées du fait de nombreuses études sur le rôle de Notch dans l'angiogenèse (cf rôle de Notch dans l'angiogenèse).

La voie du TGF β /BMP joue des rôles majeurs dans le contrôle de la différenciation, la survie et la prolifération cellulaire. En fonction du contexte, Notch peut potentialiser ou inhiber la voie TGF β /BMP.

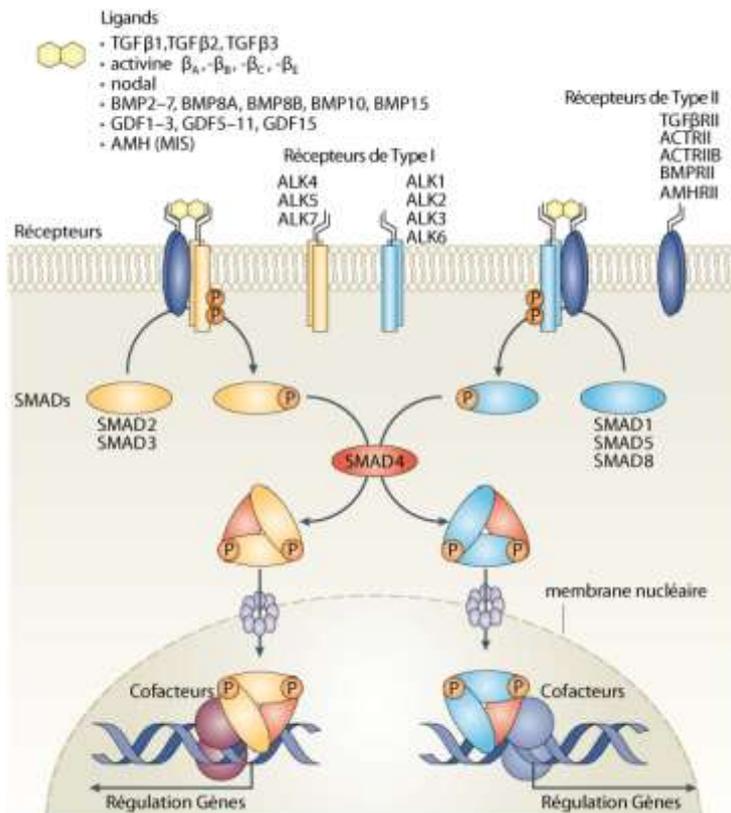


Figure 25. Voie de signalisation du TGF β
(D'après Bernhard Schmierer *et al*, 2007)

En effet, les domaines intracellulaires de Notch peuvent interagir avec Smad1, Smad2, Smad3 ou Smad4, médiateurs de l'activation de la voie TGF β /BMP (Figure 25).

Ces interactions directes peuvent dans certains cas renforcer les fonctions dépendantes de ces facteurs induits par le TGF β , ou bien au contraire bloquer leur activité. Par exemple, Notch2 et Notch3 interagissent respectivement avec de Smad3 et Smad2 pour inhiber l'expression de gènes du muscle lisse induite par le TGF β dans les myoblastes ou les fibroblastes (Ono Y. 2007; Kennard S. 2008). De même dans les cellules de muscle squelettiques C2C12, Notch4 se fixe à Smad3 et bloque le signal TGF β , Notch1 quant à lui ne présente cet effet inhibiteur que dans les cellules épithéliales (Sun Y. 2005) en séquestrant le co-activateur p300 que Notch1 et ainsi bloque la fonction anti-proliférative du TGF β (Masuda S. 2005).

Toutefois, dans d'autres modèles cellulaires et animaux, Notch et TGF β interagissent pour potentialiser leurs fonctions. Dans le rein, dans les cellules neuro-épithéliales et myogéniques, l'addition de TGF β induit l'activation de la voie Notch, ce qui est alors associé à une induction plus forte des gènes cibles du TGF β . De même, l'activation de Dll1 et de Notch1 dans cellules souches neuronales et les lymphocytes T augmente la réponse dépendante de TGF β respectivement en

interagissant avec Smad2-4 ou en favorisant la translocation nucléaire de Smad3 (Hiratochi M. 2007; Asano N. 2008). Enfin, une très récente étude montre que Notch1 recrute CSL et Smad1-3 sur le promoteur du gène *foxp3* en réponse au TGFβ pour en réguler l'expression et ainsi contrôler la maintenance de cellules T régulatrices *in vitro* et *in vivo* (Ostroukhova M. 2006).

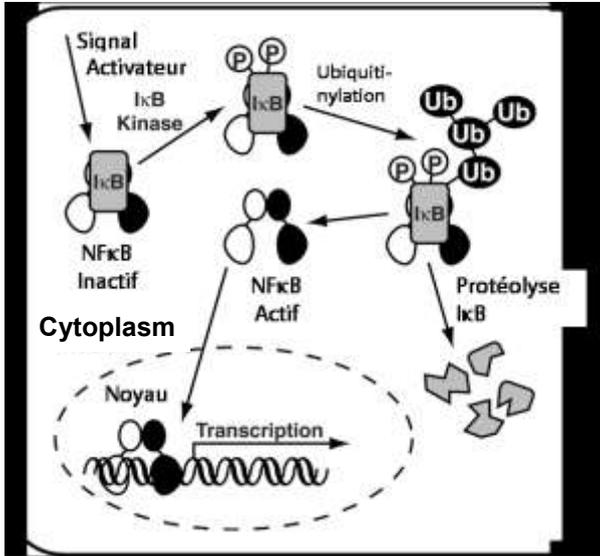
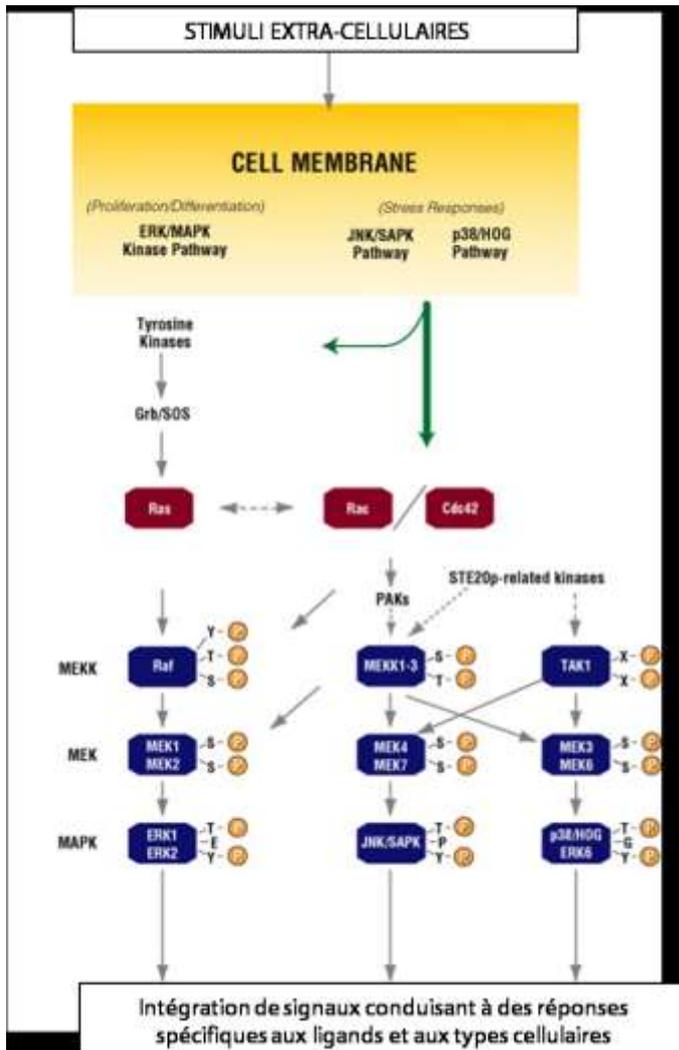


Figure 26. Voie de signalisation NFκB

De même que pour la voie du TGFβ, Notch semble pouvoir être modulé par la voie NFκB (Figure 26). Ainsi, Espinosa *et al* montrent que l'activation de NFκB via p65 (RelA) induit l'expression de Hes1 en régulant la localisation cytoplasmique du co-répresseur de la voie Notch SMRT (Espinosa L. 2003). De plus, le répresseur IκB est retrouvé au niveau du promoteur de Hes1, bloquant son expression (Aguilera C. 2004). L'activation de la voie NFκB par le TNF permet alors le recrutement nucléaire de IKKα et IKKβ qui phosphoryle IκB et induit l'expression de Hes1 après quelques minutes. Sur des temps plus longs paradoxalement, l'activation de NFκB par le TNF ne permet pas de compenser la diminution de l'expression de ce gène-effecteur de Notch supposée NFκB indépendante. Enfin, dans le cancer colorectal, le co-répresseur de Notch SMRT est phosphorylé et co-localisé de manière aberrante dans le cytoplasme. L'inhibition de la kinase IKK permet de relocalisé SMRT dans le noyau où les gènes cibles de Notch sont alors réprimés (Fernandez-Majada V. 2007).

D'autres interactions ont également été décrites avec les voies Wnt lors du développement embryonnaire, PI₃K et MAPK (Figure 27). Dans les CE plus particulièrement, l'activation de Notch1 diminue la phosphorylation et donc l'activation de Akt et de ERK1/2 induite par le VEGF (Liu Z.J. 2006). Dans les CML, l'activation de Notch3 augmente l'expression de c-FLIP en induisant la phosphorylation de ERK1/2 par un mécanisme indépendant de CSL (Wang W. 2002). Il a également été rapporté dans les CE que l'activation de JNK induit



—Figure 27. Voie de signalisation des MAPK

l'expression de Hes1 indépendamment de l'activation de récepteurs Notch (Curry C.L. 2006).

Les spécificités des interactions récepteurs-ligands sont aujourd'hui encore peu caractérisées et il est supposé que tous les récepteurs sont capables d'être activés par tous les ligands Dll et Jag. Toutefois, les modifications post-traductionnelles des récepteurs (ex. glycosylation) favorisent sélectivement les interactions avec Jag ou Dll, ainsi que l'induction de gènes-cibles différents selon la nature du ligand exprimé (Iso T. 2003). Ces observations et hypothèses suggèrent donc une régulation spatio-temporelle fine de la voie Notch en fonction du contexte cellulaire considéré. Afin de spécifier quelles sont les fonctions spécifiques des membres de la voie Notch dans un tissu donné, il est donc au préalable primordial de déterminer le profil d'expression et de régulation Notch au sein d'un tissu ou d'un type cellulaire donné.

Rôles de la voie Notch dans les vaisseaux sanguins

I. Distribution dans les cellules vasculaires

Les récepteurs et ligands de la voie sont exprimés dans les cellules endothéliales comme dans les cellules musculaires lisses. Notch1 et Notch4 sont exprimés dans les CE alors que Notch3 semble être préférentiellement présent à la surface des CML. Notch1 est également retrouvé dans les CML artérielles au cours du développement et chez l'adulte. Notch2 est quant à lui détecté dans ces deux types de cellules vasculaires (Iso T. 2003; Karsan A. 2005).

La plupart des études mettent en évidence l'expression des membres de la voie Notch au niveau de l'arbre vasculaire artériel mais quelques publications rapportent également la présence des récepteurs et des ligands au niveau des capillaires et du système veineux (Mailhos C. 2001; Villa N. 2001; Vorontchikhina M.A. 2005; Hofmann J.J. 2007).

Les ligands de la voie Notch sont également présents dans les CE comme dans les CML. Des niveaux variables de Jag2 ont été décrits dans l'endothélium, chez l'embryon comme chez l'adulte, avant et après une blessure artérielle (Tsai S. 2000; Lindner V. 2001). En contraste, Dll3 n'a pas été détecté au niveau vasculaire.

L'expression des ligands de Notch apparaît toutefois très dynamique et soumise à des régulations complexes, aussi bien temporelles que spatiales. Durant le développement embryonnaire, le premier ligand à être fortement exprimé est Dll4, suivi par Jag1 (Hofmann J.J. 2007). Le timing et la localisation de l'expression de Dll4 correspond le plus à celle de Notch1. Le phénotype des souris knock-out pour Dll4 est plus sévère que pour les souris Notch1^{-/-} et plus proche des doubles mutantes Notch1^{-/-}/Notch4^{-/-}, suggérant ainsi le rôle de ligand de Dll4 pour ces 2 récepteurs. Les transcrits de Dll4 sont détectés au niveau de la plupart des capillaires à la moitié de la période gestatoire et, au cours de la vascularisation de la rétine, Dll4 est préférentiellement exprimé par les cellules situées aux extrémités des capillaires en formation (*tip cells*) (Claxton S. 2004; Hellstrom M. 2007). A des temps de développement plus tardifs, Dll4 est présent au niveau du système vasculaire artériel, et sert généralement de marqueur pour cellules artérielles (Jones C.A. 2007). Dll4 est re-exprimé lors de néo-angiogenèse, notamment dans le contexte de certains cancers (cf page 66) (Noguera-Troise I. 2006; Ridgway J. 2006; Schemet J.S. 2007; Trindade A. 2008). Jag1 n'est pas aussi caractéristique des capillaires que ne l'est Dll4 et sa distribution au niveau vasculaire est plus complémentaire que superposable à celle de Dll4. Au cours de la vascularisation de la rétine, jag1 est exclus des « *tip cells* » mais présent au niveau des cellules quiescentes de l'arbre déjà formé (*stalk cells*). Durant le remodelage vasculaire, l'expression de Jag1 est détectée dans les cellules endothéliales comme dans les cellules musculaires lisses (Villa N. 2001; Hofmann J.J. 2007).

L'expression et la régulation différente en fonction du temps et de l'espace de ces ligands, ainsi que les phénotypes différents associés à leur mutant suggèrent que chacun de ces ligands émet des signaux distincts au cours du remodelage vasculaire.

Enfin, Dll1 est exprimé dans l'endothélium des artères et des veines des embryons à mi-gestation (Beckers J. 1999). Chez l'adulte, Dll1 est préférentiellement restreint à l'endothélium artériel et est généralement absent dans le système veineux et capillaire (Limbourg A. 2007).

II. Fonctions vasculaires de la voie Notch : Implications dans le remodelage vasculaire ?

1. Morphogenèse vasculaire

La voie de signalisation Notch est très étudiée dans les vaisseaux sanguins. Cet intérêt croissant résulte de nombreuses études impliquant Notch dans la formation des vaisseaux sanguins au cours du développement embryonnaire mais également chez l'adulte, notamment dans le cadre de la néo-angiogenèse tumorale.

Initialement, l'importance de la voie Notch dans la morphogenèse vasculaire a été démontrée dans les souris knock-out (KO) pour Notch1 qui présente une létalité *in utero* associée à de graves défauts de vasculogénèse. Ces altérations du développement vasculaire sont accentuées chez les souris doubles mutantes Notch1^{-/-} et Notch4^{-/-}, alors que l'inactivation unique de Notch4 donne des souris viables et fertiles (Krebs L.T. 2000). De plus, un allèle hypomorphe homozygote de Notch2 (faible expression de Notch2) perturbe la formation de la vascularisation du glomérule rénal, du cœur et de l'œil (McCright B. 2001).

De manière similaire, les mutations inactivantes des ligands Jag1, Dll1 et Dll4 sont létales par d'importantes perturbation de la vasculogénèse (Beckers J. 1999; Xue Y. 1999; Gale N.W. 2004). Cependant, les stades de létalité de ces mutations respectives diffèrent, suggérant des rôles spécifiques et séquentiels des ligands de Notch dans la mise en place de la vascularisation chez l'embryon.

Etonnamment, l'activation constitutive de Notch4 spécifiquement dans les CE causent également des défauts de remodelage vasculaire (Uyttendaele H. 2001; Leong K.G. 2002). Des phénotypes vasculaires comparables induits aussi bien par une activation qu'une perte constitutive de Notch suggèrent la nécessité de réguler finement l'expression/l'activité de cette voie.

Bien que les souris KO pour Notch3 soient viables et fertiles, une étude détaillée révèle tout de même l'implication de ce récepteur dans la différenciation et l'acquisition de l'identité artérielle des cellules musculaires lisses (Krebs L.T. 2003). Chez l'Homme, des mutations de Notch3 sont responsables du syndrome CADASIL (Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy) caractérisé par des migraines avec l'apparition après 30 ans, de

lésions vasculaires cérébrales aboutissant à une démence et s'accompagnant de lésions de la substance blanche cérébrale (Ruchoux M.M. 1997). Des études histologiques mettent en évidence une dégénérescence progressive des CML des artères de la peau et du cerveau qui mène à la substitution de la média par du tissu conjonctif puis à une fibrose et au rétrécissement de la lumière du vaisseau (Joutel A. 1996). Ces observations indiquent un rôle préférentiel de Notch3 dans les CML du système artériel. En effet, *in vitro* l'activation de Notch3 dans les CML permet de protéger les cellules de l'apoptose induite par Fas-L ou par une déprivation en sérum, notamment en activant la voie PI₃K/Akt et en induisant c-FLIP (Wang W. 2002). Notch3 et Notch1 induisent également la prolifération et limitent la migration des CML (Sweeney C. 2004).

Une autre pathologie humaine est associée à la voie Notch. Des mutations de Jag1 et plus rarement de Notch2 sont à l'origine du syndrome Alagille dont les principales caractéristiques sont une malformation du cœur (au niveau de l'artère pulmonaire) et du foie (défaut de développement des voies biliaires) indiquant là encore le rôle de Notch dans la formation des vaisseaux sanguins (Xue Y. 1999; McDaniel R. 2006; Yuan Z.R. 2006).

Enfin, les observations faites chez les animaux Notch3^{-/-} et Dll4^{-/-} suggèrent également un rôle de Notch dans la différenciation respective des vaisseaux en artère ou en veine. En effet, des études ont pu démontrer chez le zebrafish et la souris que la spécification artério-veineuse était contrôlée par Notch (Lawson N.D. 2001).

2. Angiogenèse

L'angiogenèse est un mécanisme de néo-vascularisation à partir d'un réseau capillaire préexistant. Elle est particulièrement importante et indispensable au cours de nombreux processus physiologiques tels que le développement embryonnaire, l'implantation du placenta mais aussi pathologique, en particulier pour la croissance des tumeurs. Pour l'ensemble de ces processus, le schéma général reste le même : l'activation des cellules endothéliales conduit à la dégradation de la membrane basale et de la matrice extracellulaire environnante ; La migration orientée des CE est suivie d'une phase proliférative ; Les cellules se différencient ensuite en une structure de type capillaire pour former un réseau vasculaire nécessaire au développement des tissus. Au cours de ces dernières années, il est devenu clair que l'angiogenèse n'est pas contrôlée par un seul facteur, mais par une balance d'inducteurs et d'inhibiteurs produits par les cellules normales ou tumorales. Parmi ces polypeptides, le FGF-2 et VEGF sont considérés comme étant des régulateurs clés de l'angiogenèse. Depuis, de nombreux travaux font état de relations et de régulations croisées entre les voies du VEGF et de la voie Notch (Weinstein B.M. 2002; Shawber C.J. 2007; Takeshita K. 2007).

Les premières études démontrant le rôle de Notch dans l'angiogenèse sont issues de l'observation des souris où Notch4 est activé de manière constitutive dans les CE, chez qui les vaisseaux ne se

développent pas correctement (Uyttendaele H. 2001). *In vitro* dans les CE humaines, cette activation de Notch4 inhibe la croissance des bourgeonnements cellulaires (*tip cells*) nécessaires à l'arborisation et à la maturation de nouveaux vaisseaux (Leong K.G. 2002; MacKenzie F. 2004; Hellstrom M. 2007). Les *tip cells* sont des cellules dotées de nombreuses extensions filopodiales qui fonctionnent comme des senseurs de l'environnement et guident la croissance des vaisseaux. Parmi les molécules de la voie Notch impliquées dans le développement vasculaire, le ligand Dll4 a suscité un intérêt particulier puisque son expression basale est restreinte aux artères et aux capillaires en bourgeonnement (Hellstrom M. 2007; Hofmann J.J. 2007). Les divers modèles expérimentaux utilisés démontrent que l'absence de la signalisation Dll4/Notch, soit par ablation génétique, inhibition pharmacologique, ou administration d'anticorps antagonistes, provoque une angiogenèse excessive par bourgeonnement vasculaire (Noguera-Troise I. 2006; Ridgway J. 2006; Hellstrom M. 2007; Schemet J.S. 2007; Suchting S. 2007). Par exemple, l'ablation d'un seul allèle *dll4* chez la souris accroît de façon spectaculaire le bourgeonnement et le branchement vasculaires au sein de la rétine (Figure 28).

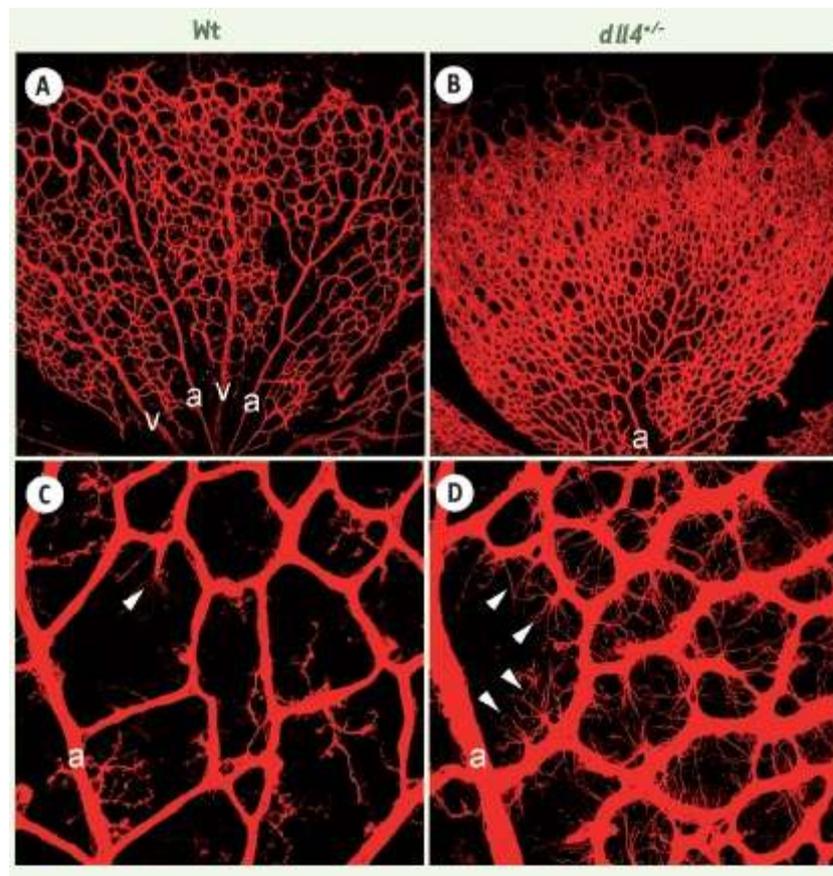


Figure 28. Effet angiogénique de Dll4: formation de nombreuses structures vasculaires non fonctionnelles.

(D'après Steven Suchting *et al*, 2007)

Dans ces modèles de tumeurs, le blocage de Notch *via* Dll4 est associé à une densité vasculaire très élevée, avec de nombreux bourgeonnements et de petites ramifications inter-capillaires, mais qui paradoxalement conduit à une réduction de 50 à 90% de la taille de ces tumeurs. Toutefois, ces

vaisseaux néo-formés s'avèrent apparemment non fonctionnels: d'une part, les tumeurs deviennent plus petites et hypoxiques (moins oxygénées) et d'autre part, beaucoup de ces structures ne sont que faiblement perfusées.

Le VEGF est nécessaire au développement des vaisseaux (Ferrara N. 2003). Néanmoins, le niveau d'expression du VEGF n'est pas modifié chez les animaux déficients en Dll4. En revanche, l'expression du VEGFR2 (KDR/FLK-1), qui relaie les effets pro-angiogéniques du VEGF, est augmentée chez les mutants *dll4*^{+/-}. L'absence de Dll4 semble donc entraîner une dérégulation de la balance d'expression des récepteurs au VEGF, avec pour ultime effet une réponse accrue au VEGF. De manière comparable *in vitro*, l'activation de Notch1 et Notch4 dans les CE, par surexpression de NICD ou de Dll4, diminue l'expression de VEGFR-2 et ainsi réduit la réponse pro-angiogéniques du VEGF (Williams C.K. 2006).

L'ensemble de ces résultats permet donc de proposer un modèle de rétro-contrôle entre la voie du VEGF et Notch : Le VEGF induit l'expression de Dll4, qui à son tour agit pour limiter la réponse du VEGF, se comportant comme un frein intrinsèque de l'angiogenèse, nécessaire au contrôle fin de la croissance vasculaire (Figure 29).

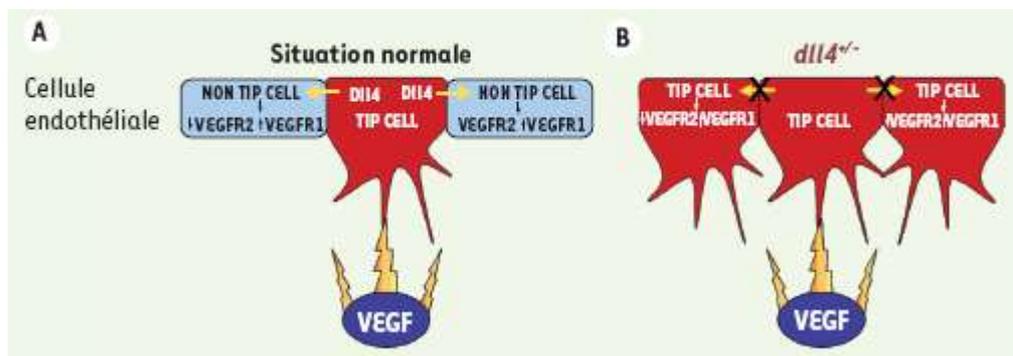


Figure 29. Modèle proposé pour le mécanisme d'action du système Dll4/Notch dans le contrôle de l'angiogenèse

En situation normale (A), le VEGF provoque l'acquisition par une cellule endothéliale (CE) d'un phénotype de tip cell ce qui se traduit par l'émergence d'un bourgeonnement capillaire. Le VEGF induit également l'expression de *dll4*. En se liant à son récepteur Notch présent sur la CE adjacente, Dll4 inhibera la formation d'une autre *tip cell* en induisant une altération du taux d'expression des récepteurs au VEGF, rendant la cellule moins sensible au VEGF. Les vaisseaux *dll4*^{+/-} (B) sont incapables de transmettre le signal inhibiteur et le nombre de CE qui répondent de façon inapproprié au VEGF et deviennent des tip cells augmente. Il en résulte un branchement et une fusion excessifs de ces vaisseaux.

(D'après Steven Suchting *et al*, 2007)

L'axe de recherche de Notch dans le domaine vasculaire est aujourd'hui très active du fait de ces récents travaux faisant ainsi émerger cette voie comme nouvelle stratégie thérapeutique anti-cancéreuse.

3. Contrôle de la survie et la prolifération des Cellules Endothéliales

Parmi les 4 récepteurs de la voie Notch, Notch4 est le seul à être restreint à l'endothélium, suggérant un rôle particulièrement important dans ce compartiment cellulaire. C'est pourquoi l'essentiel des données fonctionnelles de Notch dans les CE sont aujourd'hui limitées aux effets de l'activation de ce seul récepteur.

La régulation de la survie et de la mort cellulaire est essentielle pour le développement et l'homéostasie vasculaire. Malgré une exposition continue à des cytokines pro-inflammatoires et à des toxines exogènes, les cellules endothéliales ont une capacité remarquable à résister à l'apoptose (Karsan A. 1996).

Paradoxalement, même si Notch réprime la voie de survie de VEGFR1 et VEGFR2 dans les CE, l'activation de Notch protège ces cellules de l'apoptose par d'autres mécanismes (Williams C.K. 2006). Par contraste avec VEGFR1 et VEGFR2, VEGFR3 est induit par Notch et cette relation est impliquée dans l'angiogenèse (Shawber C.J. 2007). L'activation de Notch1 promeut la viabilité endothéliale en réponse à une déprivation de sérum mais peu de chose sont décrites concernant les mécanismes mis en jeu (Liu Z.J. 2003). D'autre part, Notch4 activé est capable d'inhiber l'apoptose des CE induite par le médiateur inflammatoire lipopolysaccharide (LPS) en réprimant la voie apoptotique dépendante des mitochondries (MacKenzie F. 2004). Cette protection est mise en jeu au moins grâce à 2 éléments. L'activation de Notch inhibe l'activation de JNK induite par le LPS selon un mécanisme dépendant de CSL. Notch permet également, par une voie indépendante de CSL, l'augmentation d'expression de la molécule anti-apoptotique Bcl-2 (MacKenzie F. 2004). Cette fonction protectrice à 2 niveaux fait de la voie Notch un acteur important de l'inhibition de la voie intrinsèque de l'apoptose endothéliale (voie mettant principalement en jeu la mitochondrie).

La prolifération des CE est aussi inhibée suite à l'activation de Notch, aussi bien par surexpression du domaine actif de Notch1, Notch2 ou Notch4, soit *via* la surexpression du ligand Jag1 par des mécanismes distincts (Liu Z.J. 2003; Nosedá M. 2004; Nosedá M. 2005; Curry C.L. 2006; Liu Z.J. 2006). D'une part, l'activation de Notch1 bloque la prolifération en bloquant la phosphorylation d'Akt et des MAPK ERK1/2 (Liu Z.J. 2006). Notch4 inhibe quant à lui la surexpression de p21^{cip1} induite par les mitogènes et retarde la phosphorylation de Rb (protéine du rétinoblastome) par les complexes Cycline D-CDK4. La diminution de l'expression de p21^{cip1} dépendante de Notch inhibe la localisation nucléaire de ces protéines, réduisant ainsi l'entrée des CE en phase S de leur cycle de prolifération (Nosedá M. 2004).

De plus, quand les CE atteignent le stade de confluence *in vitro*, la voie Notch est activée de manière constitutive avec une diminution de l'expression de p21^{cip1}. L'inhibition de l'activation de Notch à confluence bloque la diminution de p21^{cip1} et permet la phosphorylation de Rb, suggérant que

l'activation de Notch contribue à l'inhibition de contact des CE, notamment en régulant négativement p21^{cip1}.

Quelques études suggèrent que l'activation de Notch pourrait être nécessaire pour établir un phénotype endothélial mature et quiescent (Taylor K.L. 2002; Liu Z.J. 2003). Les défauts vasculaires notables observés dans les souris déficientes pour les récepteurs et ligands Notch suggèrent une mauvaise régulation de la différenciation, de la prolifération et (ou) de l'apoptose des cellules vasculaires (Xue Y. 1999; Krebs L.T. 2000; McCright B. 2001). Chez la souris, le manque de Notch1 et (ou) de Notch4 ne prévient pas la différenciation des précurseurs mésodermiques en CE. (Krebs L.T. 2000). Il est donc possible que l'activation de Notch soit requise pour maintenir la viabilité des CE uniquement au sein d'un système vasculaire mature.

4. La transition épithélio - mésenchymateuse (EMT)

Au cours de l'embryogenèse, des sous-populations de cellules épithéliales (épiblaste) réduisent l'expression de leurs molécules d'adhérence cellulaire (notamment la E-cadhérine) pour migrer dans un nouveau microenvironnement propice à une différenciation en d'autres types cellulaires (Savagner P. 2001; Ip Y.T. 2002). Cette modulation du phénotype des cellules épithéliales est appelée transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) et est indispensable pour le développement embryonnaire mais intervient également dans d'autres contextes physiologiques et pathologiques (Savagner P. 2001; Ip Y.T. 2002; Nieto M.A. 2002). L'EMT est une transformation particulière principalement étudiée dans le cadre du développement cardiaque (Wessels A. 2000). Durant la morphogenèse du cœur, des sous-populations de cellules de l'endocarde (couche la plus interne très proche de l'endothélium) doivent subir cette transformation pour envahir la matrice sous-jacente et ainsi former les valves et le septum membraneux (Wunsch A.M. 1994). D'autre part, il a été démontré que l'endothélium vasculaire mature peut donner lieu à des cellules du muscle lisse via l'EMT en faisant intervenir des contacts intercellulaires (Frid M.G. 2002).

Les récepteurs Notch et leurs ligands sont exprimés dans les régions du cœur où l'EMT a naturellement lieu et les profils d'expression de cette zone suggèrent un rôle de l'interaction Jag1-Notch dans ce processus (Loomes K.M. 2002; Nosedá M. 2004; Timmerman L.A. 2004; Leong K.G. 2007). En effet, la délétion ciblée de Notch1 ou de CSL chez la souris altère l'EMT durant le développement des coussins endocardiques (Timmerman L.A. 2004). De plus, deux études ont montré que l'activation de Notch dans les CE induisait la transition épithélio-mésenchymateuse caractérisée notamment par la perte de l'expression de la VE-cadhérine (Vascular E-Cadherin) (Nosedá M. 2004; Timmerman L.A. 2004)

Objectifs de la thèse

L'activation et la dysfonction endothéliale jouent un rôle clé dans les processus inflammatoires chroniques. En transplantation, ces processus participent activement à l'initiation et au développement des mécanismes de rejet de greffe. En effet, l'activation des CE permet dans un premier temps le recrutement des leucocytes dans le greffon, initiant ainsi les épisodes de rejet aigu. De plus, dans le cadre d'un état inflammatoire maintenu, la dysfonction endothéliale associée notamment à l'apoptose des CE contribue fortement au développement de l'artériosclérose du greffon.

Depuis plusieurs années, un des axes d'étude principaux de notre équipe au sein du laboratoire INSERM U643, est l'identification des mécanismes et des effecteurs de la dysfonction endothéliale afin de développer de nouvelles stratégies de prévention des rejets en allo- et xéno-transplantation.

Au cours de ma thèse, j'ai pu contribuer à ce travail en étudiant le rôle de la voie Notch dans l'activation et la dysfonction endothéliale associée à l'artériosclérose du greffon.

Historique du travail de thèse

Cette étude sur la voie de signalisation Notch présentée dans ce manuscrit fait suite à des travaux réalisés au sein de notre équipe. Un premier travail d'identification de cibles moléculaires impliquées dans la dysfonction endothéliale a été réalisé pour caractériser les gènes différentiellement exprimés au cours de l'activation endothéliale. Pour cette étude, des CE issues d'aortes de porcs (PAEC) ont été activées par des stimuli pro-inflammatoires, le TNF, le LPS ou par un stimulus xénogénique (sérum humain). Par la technique de *RNA Differential Display*, les niveaux d'expression des gènes ont été comparés entre la condition au repos sans traitement et les conditions activées. Ainsi, un panel de gènes différemment exprimés entre ces 2 conditions a pu être identifié. Parmi ces gènes, la protéine ADAM10 a été retrouvée fortement surexprimée dans les PAEC activées au sérum humain mais également dans les HAEC après traitement avec le TNF ou le LPS par rapport à la condition au repos (Boulday G. 2001). ADAM10 étant une des enzymes clé de l'activation des récepteurs Notch, c'est donc à la suite de cette étude que nous avons entrepris de caractériser plus avant l'implication de la voie Notch dans ce contexte biologique (Pan D. 1997).

Stratégie de Recherche

Afin d'étudier le rôle de Notch dans l'activation et la dysfonction endothéliale, l'ensemble des travaux a été réalisé dans des cultures primaires de CE d'aortes ou de veines ombilicales isolées au sein de notre laboratoire. Chez les mammifères, 4 récepteurs Notch (Notch1, 2, 3, 4) et leurs 5 ligands

(Dll1, 3, 4 et Jag1, 2) ont été identifiés. Afin de sélectionner les cibles potentielles de cette voie impliquées dans l'activation endothéliale, nous avons d'abord analysé l'expression et les régulations des molécules Notch dans les CE en réponse aux cytokines inflammatoires. Pour ce faire, j'ai dû mettre au point les anticorps, les amorces et les conditions de PCR pour chaque molécule de la voie, à savoir Notch1, 2, 3, 4, Dll1, 3, 4, Jag1, 2. De plus, afin d'estimer l'activité de la voie Notch, j'ai également développé les outils moléculaires pour analyser la transcription des gènes cibles Hes1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, et hey1, 2, 3 traduisant l'activation de la voie. Nous avons utilisé un vecteur rapporteur de l'activité canonique de Notch (dépendante de CBF1). Enfin, les mécanismes moléculaires à l'origine des régulations de Notch au cours de l'activation endothéliale ont été analysées par l'emploi d'inhibiteurs chimiques bloquant les voies NFκB, PI₃K ou JNK MAPK. L'ensemble de ces outils nous a ainsi permis de démontrer qu'en réponse aux cytokines inflammatoires comme le TNF, les CE qui expriment constitutivement toutes molécules de la voie Notch, observent une profonde modification du phénotype Notch. En particulier, nous avons obtenu que le récepteur spécifique de l'endothélium Notch4 était grandement sous-exprimé dans les CE activées alors qu'à l'inverse, le récepteur Notch2 a été retrouvé fortement surexprimé et suractivé, et ce, respectivement, via les voies NFκB et PI₃K. Ces régulations différentielles sont associées respectivement à une diminution de l'expression de Hes1 et une augmentation de Hey1, deux gènes effecteurs majeurs de la voie Notch. Toutefois, globalement, l'activation endothéliale est caractérisée par une forte baisse de l'activité constitutive de la voie Notch.

Afin d'estimer la relevance fonctionnelle de cette baisse d'expression du récepteur restreint à l'endothélium Notch4 dans la dysfonction endothéliale, nous avons également analysé l'expression des récepteurs Notch au cours de l'AG dans un modèle d'allogreffe cardiaque développé au sein du laboratoire (cf. partie 2 de la partie expérimentale). Là encore, une baisse d'expression de Notch4 a été retrouvée dans les greffons artériosclérotiques par rapport aux greffons syngéniques et tolérants. Pour tester la fonction de cette baisse de Notch4 dans la dysfonction endothéliale associée à l'AG, nous avons employé des ARN interférants (siRNA) pour inhiber spécifiquement l'expression de ce récepteur dans les CE *in vitro*. La répression de Notch4 suffit à induire une forte diminution de Hes1 et de toute l'activité Notch dépendante de CBF1, suggérant que ce récepteur joue un rôle majeur dans le contrôle de l'activité Notch dans les CE. Pour déterminer si les fonctions de Notch4 étaient corrélées à celles de l'activité de la voie, nous avons également utilisé des siRNA pour réprimer le gène effecteur Hes1. Avec ces outils, que nous avons préalablement validés, nous avons ainsi pu étudier l'impact d'une diminution de Notch4 et de l'activité de la voie Notch sur la dysfonction endothéliale. Plus précisément, nous avons analysé les conséquences sur la viabilité des CE par des tests MTT et par un marquage de la fragmentation de l'ADN par l'iodure de propidium (*DNA content*). Pour compléter cette approche, l'apoptose des CE a été évaluée par un marquage à l'annexine V. Au regard des études montrant l'impact des lésions intimes dans la survenue de l'AG,

nous avons de plus testé la capacité des CE à réparer une cicatrice intimale en suivant en temps réel par time-lapse le recouvrement d'une lésion faite sur un tapis cellulaire confluent. Enfin, nous avons évalué la répercussion de l'inhibition de Notch4 et Hes1 sur l'activation des CE en réponse ou non au TNF. Tous ces résultats sont décrits dans la partie 2 de la partie expérimentale et font l'objet d'un article actuellement en révision dans le journal *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* (ATVB).

La dernière partie de mon travail de thèse a été consacrée à l'étude fonctionnelle de l'augmentation d'expression et d'activité de Notch2 dans la dysfonction endothéliale (cf. partie 1). Pour ce faire, nous avons construit un adénovirus recombinant codant pour le domaine intracellulaire actif de ce récepteur (AdN2ICD). Cet outil permet de transduire efficacement les HAEC. La surexpression de N2ICD a un effet délétère sur la viabilité des CE en induisant l'apoptose, caractérisée comme précédemment par test MTT, DNA content, et marquage de l'annexine V. Après caractérisation de cette fonction, nous avons utilisé une puce dédiée à l'apoptose (88 gènes apoptotiques) pour identifier les cibles potentielles de Notch2 responsables de l'induction d'apoptose. En adéquation avec le rôle répresseur du gène effecteur Hey1 fortement induit par N2ICD, 7 molécules parmi les 88 testées ont été retrouvées fortement réprimées par Notch2. Par l'emploi de siRNA et d'un vecteur d'expression, nous avons finalement pu démontrer que la survivine était le principal responsable de la fonction apoptotique de Notch2 dans les CE. L'ensemble de ces données est présentée dans la partie 3 de la partie expérimentale et fait également l'objet d'un article soumis au journal *Circulation Research*.

Partie expérimentale

Partie 1

L'inflammation induit la modification du phénotype Notch dans les Cellules Endothéliales : régulation sélective de Notch 2, 3, 4 et Dll1

I. Objectif de l'étude

L'activation endothéliale induite par l'inflammation est une modification de phénotype et de fonctions de l'endothélium qui favorise le développement d'une réaction immunitaire. En transplantation, elle joue un rôle central dans les mécanismes de rejet de greffe.

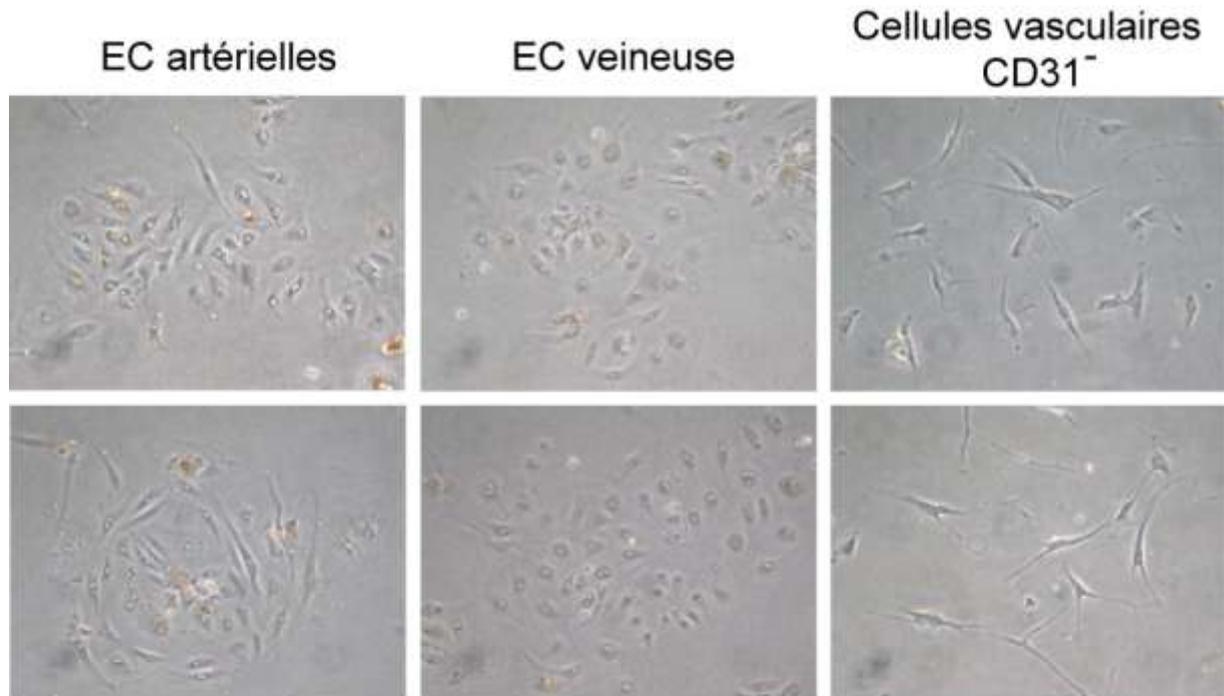
Dans une étude précédente, nous avons étudié les voies de signalisation et les molécules régulées par le TNF dans les CE (Bouliday G. 2001) (Bouliday G. 2002) (Coupel S. 2004) (Fitau J. 2006). Nous avons pu en particuliers montrer que la dysintégrine et métalloprotéinase connue sous le nom d'ADAM10 ou *Kuzbanian* était fortement surexprimée au niveau transcriptionnelle et protéique dans les CE activées par le TNF ou les anticorps anti-greffon, tous deux associés à une mauvaise survie du greffon (Bouliday G. 2001). ADAM10 est une enzyme contrôlant le clivage et l'activation des récepteurs et ligands de Notch, suggérant une relation entre la voie du TNF et la voie Notch dans les CE et pourrait ainsi contribuer aux modifications fonctionnelles et phénotypiques des CE activées.

L'objectif de cette étude est donc de déterminer l'expression et la régulation des récepteurs, ligands et molécules effectrices de la voie Notch au cours de l'activation endothéliale par le TNF afin de sélectionner les molécules Notch potentiellement impliquées dans ce processus. De plus, l'activité de la voie ainsi que les mécanismes moléculaires rôle responsables des régulations de Notch ont également été analysés.

II. Matériel et Méthodes

Culture cellulaire et réactifs

Les cultures primaires de CE artérielles humaines (HAEC), de CE de veines du cordon ombilical (HUVEC) et les CML ont été générées et cultivées comme précédemment décrit (Coupel S. 2004). Les CE sont isolées après traitement des tissus par de la collagénase 1% puis sélection positive grâce à des billes magnétiques couplées au marqueur endothélial CD31.



Cultures Primaires à 3 jours après digestion à la collagénase

Les CE sont cultivées dans du milieu de culture pour CE (basal growth medium (ECBM), Promocell, Heidelberg, Germany) supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF), 0.4% CE growth supplement/heparin, 0.1 ng/mL epidermal growth factor (EGF) humain, 1 ng/mL basic fibroblast growth factor (bFGF) humain, 1 µg/mL hydrocortisone, 50 µg/mL gentamicine et 50 ng/mL amphotéricine B. Les CML ont été cultivées avec du milieu de culture « SMC basal medium » supplémenté avec 10% FCS, 0.5 ng/mL EGF, 2 ng/mL bFGF, 5 µg/mL insuline, 50 ng/ml amphotéricine B et 50 µg/mL gentamicine (Promocell).

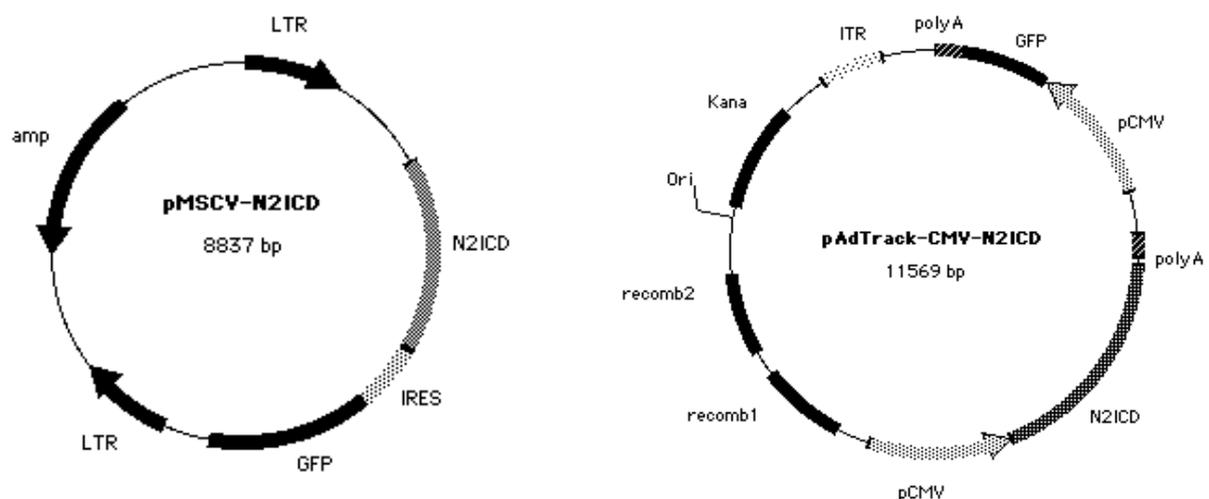
Avant le début des traitements, les CE confluentes sont cultivées dans de l'ECBM supplémenté avec seulement 2% de SVF pendant 12 à 24h. Les cultures de CE sont ensuite traitées avec différentes cytokines : IFN γ (Imukin, Boehringer Ingelheim, Germany) et TNF (Pr P. Neuman, BASF,



Ludwigshafen, Germany) humains recombinants (100U/ml), IL1 β humaine recombinante (R&D Systems, Abingdon, UK) (5ng/mL). Pour les expériences d'inhibition des voies de signalisation PI $_3$ K, NF κ B et JNK MAPK, les inhibiteurs wortmannin (100 nM), pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC; 100 μ M) et SP600125 (10 μ M) ont été ajoutés dans le milieu de culture 1h avant le traitement au TNF.

Plasmides, transfection et tests rapporteurs de l'activité Notch

La vecteur rapporteur de l'activité de Notch dépendant du système CBF1 contient 4 copies d'un site d'ancrage pour CBF1 et nous a été généreusement fourni par le Dr Diane Hayward (Université Johns Hopkins, Baltimore, Maryland, USA). Pour induire et valider ce système, les cellules ont été co-transfectées avec un plasmide codant pour le domaine intracellulaire actif de Notch2 (pAdTrack-CMV-N2ICD) sous-cloné dans le vecteur adénoviral pAdénoTrack-CMV à partir du plasmide pMSCV-N2ICD du Dr Christopher A. Klug (Université de l'Alabama à Birmingham, AL, USA).



Les préparations plasmidiques utilisées pour les transfections ont été réalisées en utilisant le kit « Plasmid Mid Prep » de Qiagen selon les recommandations du fournisseur (Qiagen, Germantown, MD, USA). Les HUVEC ont été transfectées à 70% de confluence en utilisant la Lipofectamine et le réactif PLUS pour optimiser l'efficacité de transfection. Par exemple, pour un puits de P6 (200-250.000 CE), 1 μ g de plasmide est laissé 15 minutes avec 5 μ l de Réactif PLUS dilué 100 μ l de milieu « Dulbecco's Modified Eagle's Medium » (DMEM). 3 μ l de lipofectamine dilués dans 100 μ l de DMEM sont ajoutés pour une incubation additionnelle de 15 minutes. Les particules plasmidiques sont ensuite ajoutées et diluées dans les puits de culture préalablement lavés et remplis avec 800 μ l de DMEM. Après 1 heure d'incubation, le milieu de culture est changé, les cellules lavées et remises en culture en milieu ECBM complet. La lecture de l'activité luciférase est réalisée 36h après la transfection. Au besoin, les cellules ont pu être traitées avec du TNF recombinant (100 U/mL) pendant

0 à 24h après ou non une pré-incubation d'1h de DAPT (0-10 μ M, Sigma–Aldrich). L'efficacité de transfection est vérifiée et quantifiée en parallèle par l'utilisation du vecteur rapporteur contrôle pAdTrack-CMV-GFP. Les CE sont récoltées et lysées 36h post-transfection en utilisant le tampon de lyse RLB (Promega, Madison, WI, USA). L'activité luciférase reflétant l'activité de la voie canonique Notch est finalement quantifiée après ajout de LAR (Promega, Madison, WI, USA) par un luminomètre (Wallac Victor², Perkin, Waltham, MA, USA). L'activité du gène rapporteur est exprimée en activité luciférase relative après normalisation par la quantité de protéines totale par puits.

RT-PCR Semi-quantitative, quantitative en temps réel et Southern blot

Les ARN ont été extraits et purifiés en utilisant le réactif Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) selon les recommandations du fournisseur, puis traités avec de la Dnase (Ambion, Austin, TX, USA) avant rétro-transcription (RT). Suivant la RT, les cDNA ont été amplifiés par PCR et analysés sur gel d'agarose par marquage au bromure d'éthidium. Pour la PCR semi-quantitative, les conditions de PCR ont été optimisées pour tous les couples d'amorces entre 18 et 35 cycles d'amplification pour permettre la quantification semi-quantitative de l'expression des transcrits (**Table 1**).

Pour le Southern Blot, les produits de PCR ont été purifiés selon le protocole « nucleospin extract II » (Macherey-Nagel, Hoerdt, France). Les amplicons purifiés ont été insérés dans le vecteur de clonage TOPO TA (Invitrogen) puis séquencés avant d'être utilisés en tant que sondes radio-marquées. Le southern blot et les hybridations ont été effectués comme précédemment décrit (Boulday G. 2001).

Les PCR quantitatives en temps réel (qRT-PCT) ont été réalisées sur ABI PRISM 7700 et analysées grâce au logiciel SDS[®] (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Pour la quantification, les duplicats ont été normalisés par la quantification concomitante du gène de ménage hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transférase (HPRT) et rapportée à l'échantillon contrôle référent. L'expression relative des transcrits est exprimée et ainsi calculée selon la méthode du 2- $\Delta\Delta$ Ct comme précédemment décrit (Livak K.J. 2001).

Les amorces que nous avons désignées ont été synthétisées par MWG (High Point, NC, USA), validées et utilisées pour la PCR semi-quantitative et/ou quantitative (**Table 1**). Les niveaux de transcrits par qRT-PCR ont été quantifiés grâce aux amorces et sondes de Applied Biosystems (Foster City, CA, USA) suivantes: Notch1 (Hs00413187_m1), Notch 2 (Hs00225747_m1), Notch3 (Hs00166432_m1), Notch4 (Hs00270200_m1), Dll1 (Hs00194509_m1), hey1 (Hs00232618_m1), VCAM-1(Hs00365486_m1).

Séquences des amorces et conditions pour la PCR semi-quantitative et qRT-PCR

gène	Forward (Séquence 5'-3')	Reverse (Séquence 5'-3')	Nombre de cycles PCR
Dll1	TGACGAGTGTATCCGCTATC	CACAGATTTTGCCGTAGAAG	27
Dll3	CTAAGGACGCAGGAGGGTTC	CCAATTCATTTACGGACAG	30
Dll4	GTACCTTCTCGCTCATCATC	GACAGCCCGAAAGACAGATA	27
Jag1	AGTGTCGGTCTT CCAGTCTC	CCATCATCCCGT ATATCTTC	27
Jag2	AAGGTGGAGACG GTTGTTAC	TGGTGAATTTGTGTGAGAGG	30
Notch1	GACGGACCCAACACTTACAC	TCAGGCAGAAGCAGAGGTAG	25
Notch2	GCAGGAGGTGGATGTGTTAG	CCAGGATCAGGGGTGTAGAG	21
Notch3	CTCATCCGAAACCGCTCTAC	AGTCTCTCCTGGGCTACGTC	27
Notch4	TGTTTGATGGCTACGACTGT	TCCTTACCCAGAGTCCTACC	25
Hes1	AGAGGCGGCTAAGGTGTTTG	GAGAGGTGGGTTGGGGAGTT	25
Hes2	TCATCCTGCCGCTGCTGGG	TACCCTGGAGCTGCTGAAG	30
Hes3	TCCTCCTCCCCGAAAGTCTC	CACGACCAGAACGGACGACT	35
Hes4	CTCAGCTCAAAACCCTCATC	GCGGTACTTGCCCAGAACGG	30
Hes5	TGGGGTTGTTCTGTGTTTGC	CAGACCACCAGGCACACTCA	35
Hes6	CCCTGAGGCTGAACTGAGTC	CTACCCACCACATCTGAAC	30
Hes7	TAGGGGTGGGGTAGAGACTC	AGACAGAAGGGAAGGGAAAG	35
hey1	CAGGCAACAGGGGGTAAAGG	GTGGAGCGGATGATGGTGGT	27
hey2	GTCGCCTCTCCACAACTTCA	CTGGACGTGGCTGATACTGA	27
hey3	TGGGACAGGATTCTTTGATG	GGTAAGCAGGAGAGGAGACA	35
VCAM-1	AATGTTGCCCCAGAGATAC	TCTCCTGTCCTCGCTTTTTT	27
β-actin	TCTGGCACCACACCTTCTAC	CAGCTTCTCCTTAATGTCAC	18
GAPDH	TCATCCCTGCCTCTACTGG	CACCACCCTGTTGCTGTAG	18

Western Blot

Les cellules ont été lysées sur glace dans 20 mmol/L Tris-HCl (pH 7.4), 137 mmol/L NaCl, 0.05% Triton X-100, 1 mmol/L phenylmethylsulfonyl fluoride supplémentés avec un cocktail d'inhibiteurs de proteases (Sigma–Aldrich). Les lysats cellulaires ont ensuite été déposés dans des gels d'électrophorèse (SDS-PAGE de 6 à 10% en polyacrylamide). Les protéines ainsi séparées par leur

taille et transférées sur membrane de nitrocellulose par un transfert semi-sec (Biorad) ont été détectées par les anticorps spécifiques suivants: Notch1 (Upstate Technology, Waltham, MA, USA), Notch2 (C651.6DbHN, Developmental Studies Hybridoma Bank, IA, USA), Notch3 (R&D systems, Abingdon, UK), Notch4 and Dll1 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) et anti-GAPDH (Oncogene, MERCK EuroLab, Val de Fontenay, France). La fixation des anticorps secondaires couplés à la peroxydase de radis noir (*horseradish peroxydase HRP*) anti-lapin, anti-souris ou anti-chèvre (Cell Signaling Technology, St Quentin-en-Yveline, France) a été révélée par chimiluminescence (Amersham).

Statistiques

Les données sont exprimées en moyenne (\pm erreur standard) de multiples expériences ($n \geq 3$). L'analyse statistique a été réalisée par le logiciel Graphpad Prism® (Graphpad Software, San Diego, CA) selon un test d'analyse de variance paramétrique. Les différences ont été considérées comme significatives pour les valeurs $p < 0.05$.

III. Résultats

- *Expression constitutive et Régulation de l'expression des Récepteurs et Ligands de la voie Notch au cours de l'Activation Endothéliale*

Le profil d'expression des récepteurs Notch (Notch1, 2, 3 et 4) et leurs ligands (Dll1, 3, 4, et Jag1, 2) a été analysé dans les CE au repos et activées par des cytokines. Pour ce faire, les cultures primaires d'HAEC ont été traitées de 0 à 24 h avec du TNF et les niveaux de transcrits ont été d'abord analysés par RT-PCR semi-quantitative puis les régulations ont ensuite été validées et quantifiées par qRT-PCR (Figure 30).

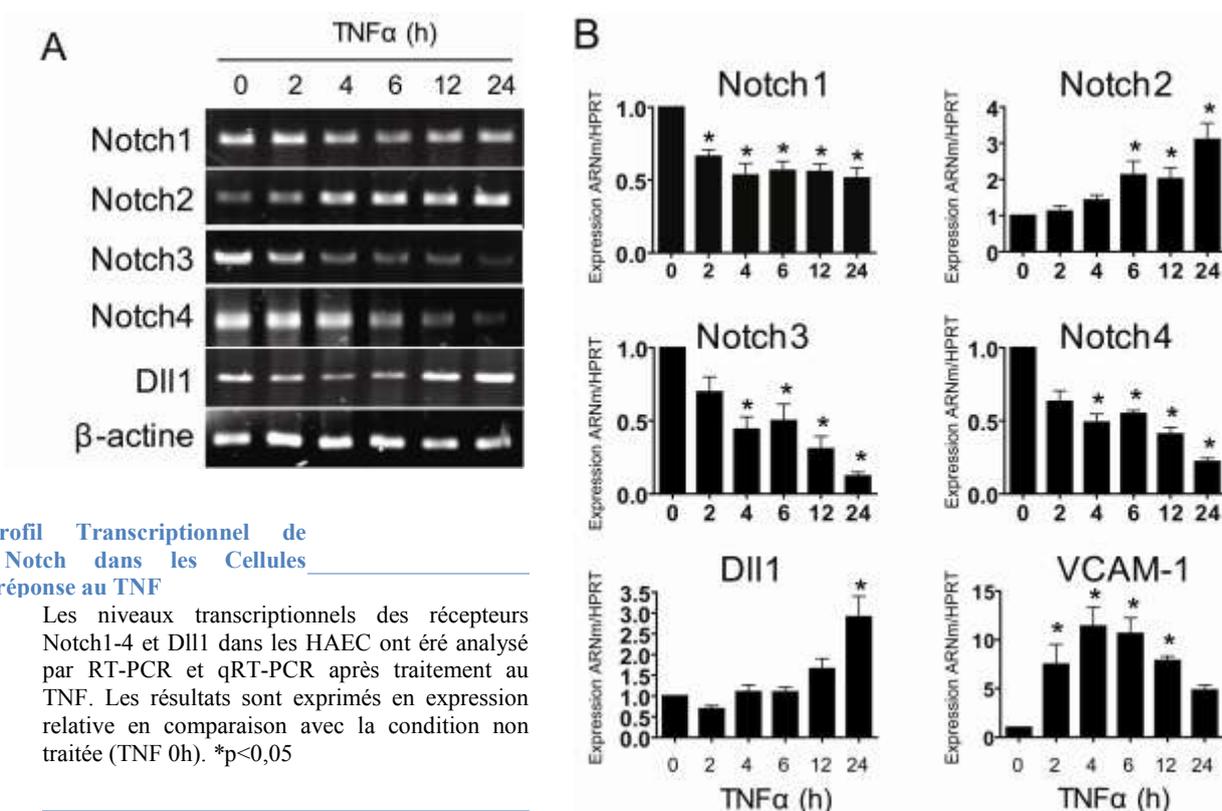


Figure 30. Profil Transcriptionnel de régulation de Notch dans les Cellules Endothéliales en réponse au TNF

Les niveaux transcriptionnels des récepteurs Notch1-4 et Dll1 dans les HAEC ont été analysés par RT-PCR et qRT-PCR après traitement au TNF. Les résultats sont exprimés en expression relative en comparaison avec la condition non traitée (TNF 0h). * $p < 0,05$

Comme le montre la figure 30A, les transcrits de tous les récepteurs Notch sont détectés dans les HAEC au repos indiquant que les HAEC quiescentes expriment tous les récepteurs Notch. Nos résultats montrent également que ces molécules sont sélectivement régulées au cours de l'activation endothéliale par le TNF. En effet, le TNF diminue le niveau d'expression de Notch1, 3 et 4 avec un effet significatif dès 2 heures après addition de la cytokine pour atteindre un effet maximal à 24h avec une inhibition de $49 \pm 7\%$, $88 \pm 2\%$ et $78 \pm 2\%$ par rapport aux niveaux constitutifs, respectivement. A l'inverse, une augmentation significative du niveau d'expression transcriptionnelle de Notch2 en réponse au TNF pour atteindre 3.3 ± 0.3 -fois le niveau initial à 24 h ($p < 0.05$) (figure 30B). De même que pour les récepteurs, tous les ligands de Notch ont été retrouvés dans les HAEC au repos. Parmi ces

molécules, Dll3, Dll4, Jag1 et Jag2 ne se sont pas régulés significativement par le TNF. L'expression constitutive de Dll1 a été retrouvée jusqu'à 3.1 ± 0.3 plus élevée dans les CE activées par le TNF avec un effet maximal à 24h de traitement ($p < 0.05$). En parallèle, l'induction de la molécule d'adhésion VCAM1 médiée par le TNF a permis de valider l'activation des CE.

L'analyse par western blot présentée par la figure 31 montre, en parallèle de VCAM1, des expressions et des régulations comparables à celles observées au niveau transcriptionnel pour Notch2, 3, 4 et Dll1.

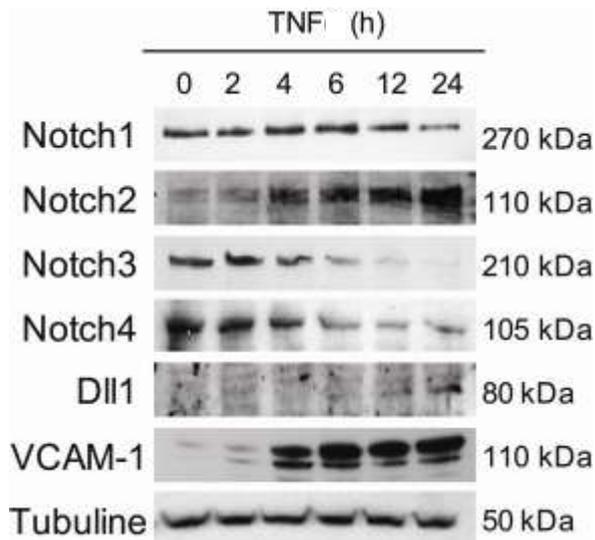


Figure 31. Profil Protéique de régulation de Notch dans les Cellules Endothéliales en réponse au TNF

Les niveaux protéiques des récepteurs Notch1-4 et Dll1 dans les HAEC ont été analysés par WB après traitement au TNF. Les résultats montrés sont représentatifs d'au moins 3 expériences indépendantes.

Ces résultats suggèrent donc que le TNF induit dans les CE une régulation importante et sélective de l'expression de ces molécules au cours de l'activation endothéliale.

A l'inverse, le récepteur Notch1 n'a pas été retrouvé significativement sous-exprimé par le TNF suggérant que Notch1 n'est pas une molécule cible majeure des cytokines pro-inflammatoires en comparaison de Notch2-4 et de Dll1. Dès lors, Notch1 n'a pas fait l'objet des investigations suivantes de notre étude.

- *Activité constitutive et Régulation de l'activité de la voie de signalisation Notch dans les CE vasculaires activées par le TNF*

La transcription des facteurs répresseurs Hairy/Enhancer of split (Hes) et Hairy-related (hey) a été montrée dépendante de l'activation des récepteurs Notch (Iso T. 2003). De ce fait, l'activité de la voie Notch est reflétée par l'expression des transcrits pour les gènes Hes et hey.

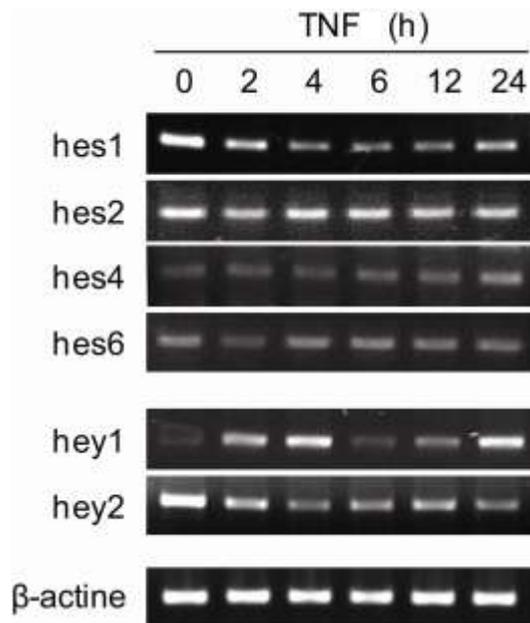


Figure 32. Expression constitutive et régulation des gènes effecteurs de la voie Notch Hes/Hey au cours de l'activation endothéliale

Après 2, 4, 6, 12 et 24h de traitement au TNF, les niveaux de transcrits des gènes effecteurs de la voie Notch Hes et Hey ont été analysés par RT-PCR semi-quantitative dans les HAEC. Les résultats montrés ici sont représentatifs d'au moins 3 expériences indépendantes.

Pour analyser la régulation de l'activité de la voie Notch au cours de l'activation endothéliale, les CE ont été incubées avec du TNF de 0 à 24h puis les niveaux des ARNm pour les gènes Hes 1, 2, 3, 4, 5, 6, et 7 et hey 1, 2 ont été étudiés par RT-PCR. Comme le montre la figure 32, les CE expriment de manière constitutive Hes1, 2, 4, 6 et hey1, 2 et 3 alors que les transcrits de Hes3, 5, 7 et hey3 n'ont pas été détectés par cette méthode. Parmi tous ces gènes effecteurs de Notch, seul hey1 a été retrouvé surexprimé de manière cyclique à 2 et 4h puis à 12 et 24h dans les CE activées par le TNF. A l'inverse, après traitement au TNF, les niveaux de transcrits de Hes1 et hey2 sont moindres par rapport aux niveaux des cellules au repos.

De plus, pour préciser si l'augmentation d'expression de Notch2 est associée à une augmentation de l'activation de ce dernier, nous avons réalisé une étude de western blot en utilisant un anticorps dirigé contre un épitope exposé après clivage et donc activation du récepteur. Ce réactif nous a permis de déterminer tout d'abord que ce récepteur est activé de manière constitutive dans les CE et qu'en réponse au TNF, il est sur-activé de manière transitoire avec un maximum à 6h de traitement (figure 33).

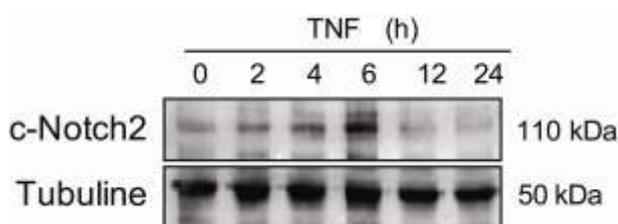


Figure 33. Activation du récepteur Notch2 dans les Cellules endothéliales en réponse au TNF

Après 2, 4, 6, 12 et 24h de traitement au TNF, les HAEC sont lysées pour en extraire les protéines. Le niveau d'activation du récepteur Notch2 est analysé par Western Blot à l'aide d'un anticorps reconnaissant un épitope accessible uniquement après clivage de Notch2. Les résultats montrés ici sont représentatifs d'au moins 3 expériences indépendantes.

L'ensemble de ces variations indiquent des régulations sélectives des effecteurs et de l'activité respective des récepteurs. Alors que Notch3 et 4 sont moins présents et moins actifs, reflétés par la baisse de Hes1 et de hey2, Notch2 est quant à lui surexprimé et suractivé et potentiellement associé à l'effecteur hey1.

Afin d'étudier l'impact du TNF sur l'activité globale de la voie Notch dans les CE, les CE ont été transfectées avec un plasmide rapporteur codant pour la luciférase sous le contrôle d'une séquence promotrice contenant 4 sites de liaison pour CBF1 (4xwtCBF1-Luc; pJH23A). Après transfection, les CE ont été traitées au TNF pendant 0, 6, 12 et 24 ou avec du [N-3,5-difluorophenylacetyl-S-phenylglycine t-butylester (DAPT), un inhibiteur de la γ -sécrétase (Micchelli C.A. 2003). La figure 34 montre que le TNF diminue très efficacement l'activité Notch dépendante de CBF1 avec une réduction significative à 12h et maximale à 24h de traitement ($66 \pm 18\%$ et $94 \pm 6\%$ de réduction, respectivement par rapport au contrôle non traité). De plus, les CE cultivées en présence de l'inhibiteur de γ -sécrétase présentent une activité CBF1 inhibée de $80 \pm 11\%$, vérifiant que le DAPT est efficace pour inhiber l'activité constitutive de la voie canonique de Notch dans les CE au repos. Enfin, une cotransfection du système rapporteur CBF1/luciférase et d'un plasmide codant pour le domaine actif de Notch2 (pAdN2ICD) a été utilisée comme contrôle positif démontrant que le NICD induit l'activité CBF1/luciférase dans les CE.

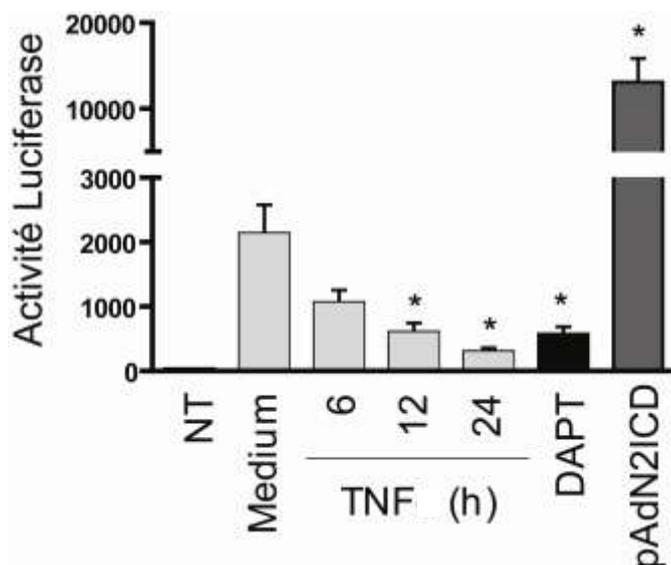


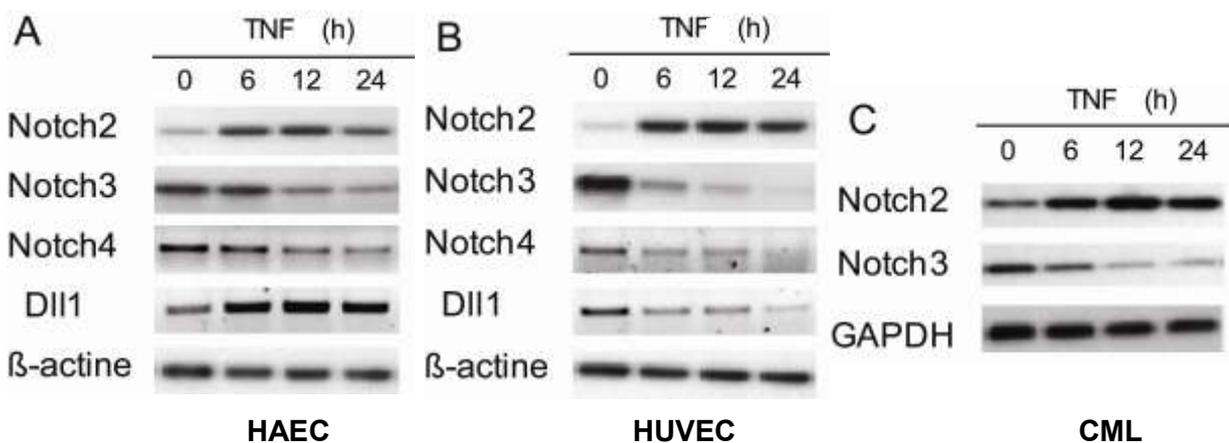
Figure 34. Régulation de l'activité globale de Notch dépendante de CBF1 en réponse au TNF

Les HUVEC sont transfectées avec un plasmide rapporteur codant pour le gène de la luciférase sous le contrôle de 4 copies de sites de liaison à CBF1. Après transfection, les CE sont traitées par le TNF (6-24h), par le DAPT (24h) ou laissées dans leur milieu de culture (Medium). La cotransfection du plasmide rapporteur et d'un plasmide codant pour le domaine intracellulaire actif de Notch2 (pAdN2ICD) constitue notre contrôle positif. L'activité globale de la voie Notch est donc rapportée par l'activité luciférase et exprimée en unité arbitraire. * $p < 0.05$. (NT : Non Transfectées)

En conclusion, ces résultats suggèrent que, tout d'abord, la voie Notch est activée constitutivement dans les CE au repos reflétée par l'expression des gènes effecteurs Hes/hey et de l'activité basale du promoteur dépendant de CBF1. De plus, au cours de l'activation endothéliale par le TNF, alors que le récepteur Notch2 et hey1 montrent une activation de la voie Notch, l'activité globale de la voie est fortement diminuée, reflétée par la baisse d'expression de Notch3, 4, Hes1 et hey2 ainsi que l'activité globale dépendante de CBF1.

- *Régulation de la voie Notch dans les cellules vasculaires: points communs et spécificité des types cellulaires*

Pour mieux caractériser les modulations d'expression et d'activité des molécules de la voie Notch dans les processus inflammatoires, nous avons étendu notre étude à d'autres types de cellules vasculaires. Pour ce faire, les cultures primaires de CE artérielles et d'autre origine vasculaire, dont les HUVEC issues des veines du cordon ombilical, ainsi que des CML ont été incubées avec du TNF recombinant pour faire l'objet d'une étude transcriptionnelle. Les résultats exposés par le figure 3 montrent tout d'abord que comme les HAEC, les HUVEC au repos expriment constitutivement Notch2, 3, 4 et Dll1. Une régulation similaire des récepteurs Notch2-4 est observée dans les HUVEC en comparaison avec les HAEC en réponse au TNF, avec une baisse d'expression de Notch3 et 4 alors que Notch2 est lui surexprimé dans les CE activées (Figure 35A et 35B). De plus, l'amplitude de ces régulations communes est plus importante dans les HUVEC que dans les HAEC. Toutefois, le TNF semble affecter différemment l'expression du ligand Dll1 dans les HUVEC où son niveau d'ARNm est réduit dans les HUVEC alors qu'induit dans les HAEC, suggérant une régulation partiellement spécifique de la voie Notch dans les CE en fonction de leur origine vasculaire.



A la différence des CE, les CML expriment un nombre limité de molécules de la voie Notch. Dans ce modèle cellulaire, nous n'avons pas pu détecter de transcrits pour Notch1, Notch4, Dll 1 and Dll4. Les CML expriment néanmoins Notch2 et Notch3 de manière constitutive. Tout comme les CE, les CML répondent au TNF par une forte augmentation de l'expression de Notch2 (environ 4.2 fois le niveau observé au repos) et une extinction de l'expression de Notch3 (Figure 35C).

Nous avons ensuite comparé pour ces 3 types cellulaires les régulations de gènes effecteurs Hes1 et hey1 reflétant l'activité de la voie Notch (Figure 35D-F). Comme pour les HAEC, les HUVEC et CML expriment fortement Hes1 et de faibles niveaux de hey1. En réponse au TNF, un profil de

régulation comparable aux HAEC est observé, à savoir une forte diminution de l'expression de Hes1 ainsi que l'induction de hey1.

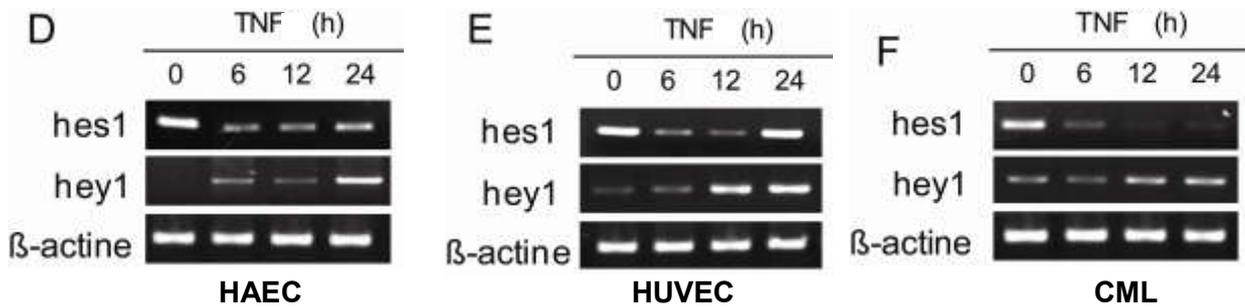


Figure 35. Analyse comparative des effets du TNF sur Notch2, 3, 4 et Dll1, hes1 et hey1 dans les CE et les CML

Des cultures primaires confluentes de HAEC (A, D), HUVEC (B, E) et de CML (C, F) ont été traitées pendant 0, 2, 4, 6, 12 ou 24 h avec du TNF.

(A,B,C) Les ARNm de Notch ont été analysé par RT-PCR semi-quantitative. Après amplification par PCR, les amplicons ont été transférés sur membrane et hybridés avec des sondes spécifiques radiomarquées pour Notch2, Notch3, Notch4, Dll1, β-actine et la GAPDH, respectivement. Les autoradiographies montrées sont représentatives de 3 expériences indépendantes.

(D, E, F) Les niveaux de transcrits des gènes effecteurs hes1 et hey1 ont été étudié par RT-PCR semi-quantitative. Les résultats sont représentatifs d'au moins 3 expériences indépendantes.

Ces résultats suggèrent donc que le TNF agit d'une façon similaire sur les molécules de la voie Notch dans les CE comme dans les CML, au niveau de l'expression des récepteurs et des gènes-effecteurs Hes1 et hey1 suggérant des mécanismes moléculaires communs. Toutefois, le profil d'expression différent entre CE et CML ainsi que la différence de régulation de Dll1 entre HAEC et HUVEC indiquent que des spécificités cellulaires persistent quant à la réponse de la voie Notch au TNF.

- *Régulation de la voie Notch dans les CE : spécificités cytokiniques*

Nous avons ensuite étudié si l'expression de Notch pouvait être régulé par d'autres cytokines que le TNF. Pour répondre à cette question, la qRT-PCR a été utilisée pour quantifier les niveaux de transcrits de Notch2, 3, 4 et Dll1 en réponse au TNF ainsi qu'à d'autres cytokines pro-inflammatoires l'interleukine-1β (IL1β) et l'interféron-γ (IFNγ) et au facteur de croissance pro-angiogénique VEGF (Figure 36).

Une augmentation comparable de Notch2 et Dll1, aussi bien pour l'amplitude que pour la cinétique, a été observée dans les CE activées par le TNF et l'IFNγ. L'IL1β induit un effet similaire avec un maximum obtenu plus précocement dès 6h de traitement à 2.3 ± 0.3 -fois pour Notch2 et 3.7 ± 0.2 -fois pour Dll1 par rapport aux cellules non traitées. Notch3, qui était progressivement sous-exprimé par le TNF (inhibition de $88 \pm 2\%$ à 24 h), a également été retrouvé inhibé par l'IL1β et l'IFNγ. Enfin, Notch4 montre le même profil de régulation en réponse au TNF et à l'IL1β avec une

réduction d'expression maximale de $65 \pm 5\%$ et $69 \pm 1\%$ pour le TNF et l'IL1 β , respectivement. Par contre, l'IFN γ n'a montré aucun effet significatif sur l'expression de ce récepteur. Le VEGF, n'induit aucune modification d'expression pour toutes ces molécules.

Ces données suggèrent que les cytokines inflammatoires induisent des profils de régulation de la voie Notch relativement comparables pour Notch2, 3 et Dll1. Notch4, dont l'expression n'est pas régulée par l'IFN γ pourrait posséder des voies de régulation spécifique. De plus, le faible effet du VEGF sur ces molécules Notch implique leur relevance fonctionnelle spécifique dans un contexte inflammatoire

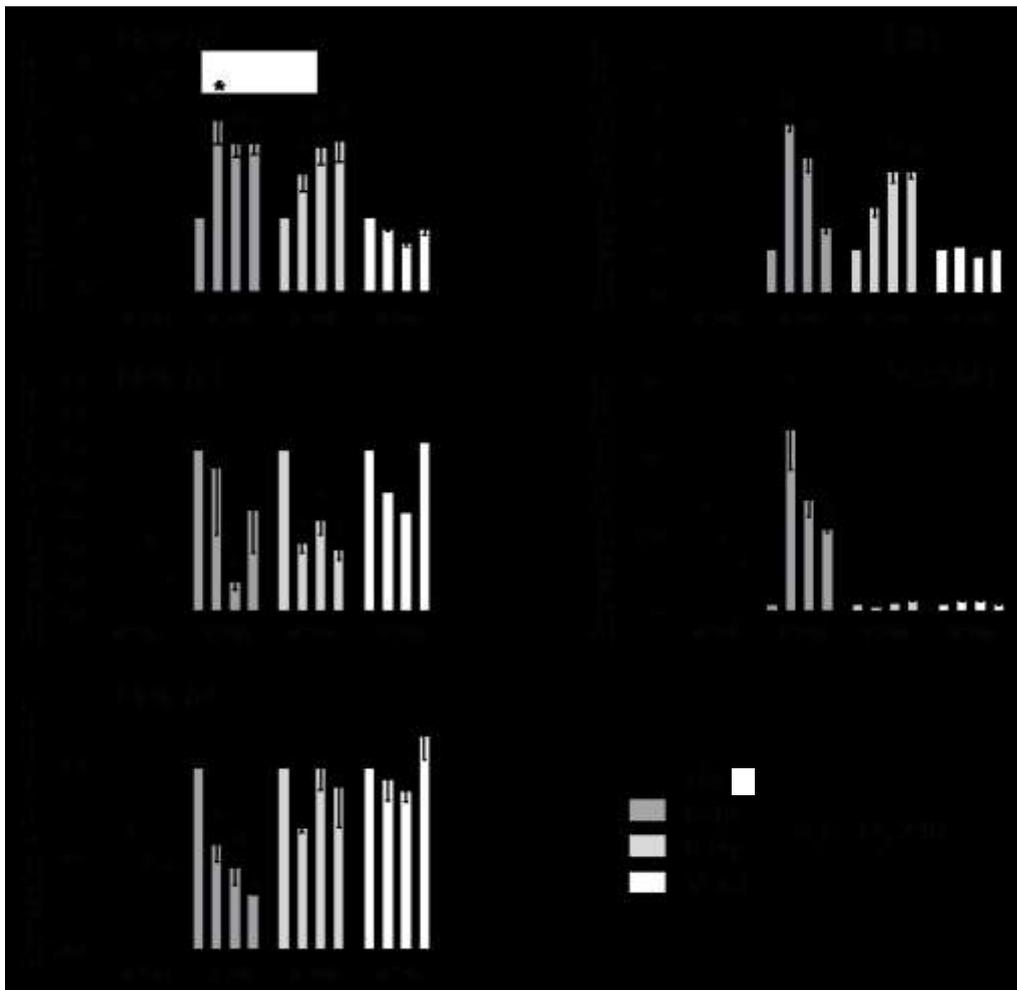


Figure 36. Comparatif des effets de facteurs solubles sur la voie de signalisation Notch

Les cultures d'HAEC ont été traitées pendant 0, 6, 12 ou 24h avec du TNF, de l'IL1 β , de l'IFN γ ou du VEGF. La régulation transcriptionnelle de Notch2, 3, 4 et Dll1 a été analysée par qRT-PCR. Les résultats sont la moyenne d'au moins 3 expériences indépendantes et exprimés en expression relative, calculés selon la méthode du $2^{-\Delta\Delta Ct}$, après normalisation par l'HPRT. (* $p < 0.05$ versus condition non traitée (0h)).

et
non
angio
génique

ue (à l'inverse de Notch1 ou de Dll4).

- *Régulation des molécules Notch par le TNF : rôles sélectifs des voies de signalisation NFκB, PI₃ kinase et MAP kinase*

Dans les CE, le TNF active plusieurs voies de signalisation dont la voie de la phosphatidylinositol 3-kinase (PI₃K), du nuclear factor-κ B (NFκB) et des mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathways (Madge L.A. 2001). L'implication respective des ces voies dans les régulations de Notch dépendantes du TNF a été évalué ici par qRT-PCR. Notre étude a été restreinte aux molécules régulées par le TNF dans les CE : Notch2, 3, 4 et Dll1. Pour ce faire, les HAEC ont été prétraitées avec ou sans inhibiteurs des voies de signalisation (PDTC, wortmannin ou SP600125) 1h avant d'avoir été activées 24h par le TNF. L'inhibition spécifique et efficace des voies respectives a été confirmée pour chaque inhibiteur par western blot dans une étude précédente (Fitau J. 2006) (données non montrées).

Nous avons ainsi pu démontrer que le blocage de la PI₃K par la wortmannine n'affecte en rien les régulations de Notch3, Notch4 et Dll1 par le TNF. Par contre, elle prévient complètement l'induction d'expression de Notch2 provoquée cette cytokine inflammatoire.

De plus, le blocage efficace de la diminution de Notch3 et Notch4 a pu être obtenu par addition de PDTC. Alors que le TNF réduit les niveaux transcriptionnels de Notch3 et Notch4 de $87 \pm 5\%$ et de $64 \pm 1\%$, respectivement ($p < 0.05$ versus contrôle), l'inhibition de NFκB par le PDTC ne permet plus qu'une réduction respective de $11 \pm 12\%$ and $13 \pm 5\%$ après traitement au TNF. L'inhibition de NFκB affecte également efficacement l'induction de Dll1 produite par le TNF. Par ailleurs, ces effets ont été confirmés avec le NAC, un autre inhibiteur de NFκB (données non montrées).

Enfin, le blocage de c-Jun N-terminal kinase (JNK) MAPK avec le SP600125 restaure jusqu'à 54% l'expression de Notch3 réprimée par le TNF, suggérant un rôle additionnel de cette voie dans la régulation de ce récepteur. Nous n'avons pas observé d'effet synergique du PDTC avec la wortmannin et le SP600125 pour Notch2, 3 or 4 (données non montrées).

En conclusion, ces résultats montrent que les modulations du niveau de transcription induites par le TNF sont sélectives et au moins dépendantes de l'activation des voies PI₃K, NFκB et JNK MAPK

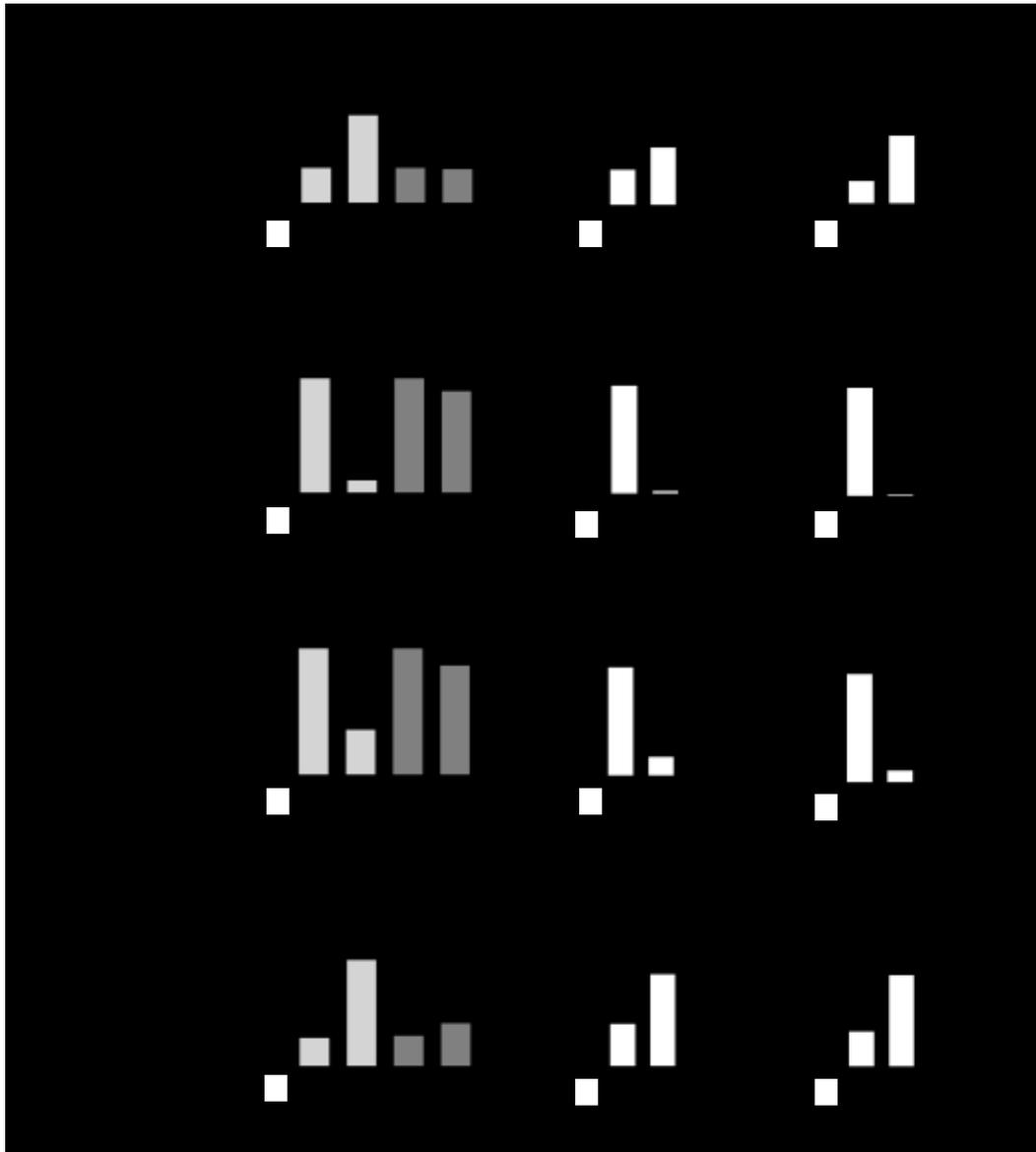


Figure 37. Voies de signalisation impliquées dans la régulation de Notch2, 3, 4 et Dll1 par le TNF.

Les cultures d'HAEC ont été prétraitées 1h avec les inhibiteurs NAC, SP600125 (10 μ M) ou wortmannine avant d'être activées 24h avec du TNF. La régulation transcriptionnelle de Notch2, 3, 4 et Dll1 a été analysée par qRT-PCR. Les résultats sont la moyenne d'au moins 3 expériences indépendantes et exprimés en expression relative, calculés selon la méthode du $2^{-\Delta\Delta C_t}$, après normalisation par l'HPRT. (*p < 0.05 *versus* contrôle respectif).

Partie 2

(Article 1)

L'inhibition de l'activité de Notch4 induit l'apoptose et l'activation des Cellules Endothéliales : implications dans l'artériosclérose du greffon

I. Résumé de l'article

La voie de signalisation Notch contrôle des fonctions majeures dans les cellules vasculaires et les cellules endothéliales (CE) en particulier. Toutefois, le rôle de Notch dans les vaisseaux de greffons durant le développement de l'artériosclérose du greffon (AG) reste inconnu. Cette étude a donc pour objectif d'analyser la régulation de la voie Notch au cours de l'artériosclérose d'allogreffe cardiaque et d'en estimer les implications dans la dysfonction endothéliale associée à cette pathologie.

Nos résultats montrent que, parmi les récepteurs Notch, les niveaux de transcrits de Notch2, 3 et 4 sont fortement diminués dans l'AG en comparaison des allogreffes syngéniques ou tolérées. L'AG est associée à une forte expression de TNF, TGF β et d'IL10 dans les greffons, cytokines qui provoquent une forte baisse de Notch4 dans les CE en culture. Nous avons également démontré que l'inhibition de l'activité de la voie Notch, reflétée aussi bien par la baisse d'expression de Hes1 et de l'activité dépendante de CBF1, corrèle avec la diminution de Notch4 médiée par le TNF dans les CE. Le blocage de Notch4 et d'Hes1 par ARN interférence augmente l'expression de VCAM-1 et induit l'apoptose des CE. L'extinction de Notch4 et d'Hes1 inhibent également fortement les capacités réparatrices des CE en réponse à une lésion endothéliale. Nos résultats suggèrent donc que l'expression de Notch4 et de l'activité basale de la voie Notch sont requise pour maintenir la quiescence des CE et pour assurer une bonne survie et un potentiel cicatriciel optimal.

En conclusion, ces données indiquent que l'altération de l'expression et de l'activité de Notch4 dans les CE du greffon est un événement clé associé à l'AG en induisant l'activation et l'apoptose endothéliale.

II. Article

Impaired Notch4 activity elicits Endothelial Cell activation and apoptosis: Implication for Transplant Arteriosclerosis

Running title: Altered Notch4 elicits EC activation and apoptosis

Quillard T.; Coupel S.; Coulon F.; Fitau J.; Chatelais M.; Cuturi MC.; Chiffolleau E. and Charreau B.

INSERM, U643, Nantes, F44000 France; CHU Nantes, Institut de Transplantation et de Recherche en Transplantation, ITERT, Nantes, F44000 France; Université de Nantes, Faculté de Médecine, Nantes, F44000 France.

Correspondance to B. Charreau, INSERM U643, CHU Hôtel Dieu, 30, bd Jean Monnet, 440093 Nantes cedex 01, France, Beatrice.Charreau@univ-nantes.fr.

Tel.: +33 (0)2-40-08-74-16

Fax: +33 (0)2-40-08-74-11

Sous presse dans *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*

Abstract

Objective — Notch signaling pathway controls key functions in vascular and endothelial cells (EC). However, little is known about the role of Notch in allografted vessels during the development of transplant arteriosclerosis (TA). This study investigated regulation of the Notch pathway upon cardiac allograft arteriosclerosis and further examined its implication in EC dysfunction.

Methods and Results — Here we show that, among Notch receptors, Notch2, 3 and 4 transcript levels were markedly down-regulated in TA compared to tolerant and syngeneic allografts. TA correlates with high levels of TNF, TGF β and IL10 that consistently decrease Notch4 expression in transplants and cultured EC. We found that inhibition of Notch activity, reflected by both a reduced CBF1 activity and Hes1 expression, parallels the down-regulation of Notch4 expression mediated by TNF in EC. Notch4 and Hes1 knockdown enhances VCAM-1 expression and promotes EC apoptosis. Silencing Notch4 or Hes1 also drastically inhibits repair of endothelial injury. Overall, our results suggest that Notch4 and basal Notch activity are required to maintain EC quiescence and for optimal survival and repair in response to injury.

Conclusion — Together, our findings indicate that impaired Notch4 activity in graft EC is a key event associated with TA by triggering EC activation and apoptosis.

Key words: Transplant Arteriosclerosis, Notch, Endothelial Cells, Activation, Apoptosis.

Condensed Abstract

Notch pathway controls key functions in vascular cells. Here we report that Notch2,-3,-4 transcripts are down-regulated in transplant arteriosclerosis. Consistently, inflammatory cytokines decrease Notch4 expression and Notch activity in endothelial cells. Notch4 or Hes1 knockdown promotes endothelial activation and apoptosis, both events that contribute to transplant arteriosclerosis pathogenesis.

Introduction

Transplant arteriosclerosis (TA) is the main limitation for long-term functioning of solid organ allografts¹. In TA, allograft arteries characteristically develop severe, diffuse intimal hyperplasia that ultimately allows luminal stenosis and cause ischemic graft failure. Characteristics of the lesions include endothelial cell (EC) damage, mononuclear cell infiltration, smooth muscle cell (SMC) proliferation, and matrix protein deposition in the intima of the vessel wall². Neointimal formation begins only after EC loss followed by SMC recruitment at the sites of injury suggesting that endothelial injury and/or denudation is an important proximal step that initiate vasculopathy³. Recipient alloreactive T cells and antibodies, as well as infiltrating macrophages and NK cells, can all contribute to EC apoptosis and vascular injury⁴. Development of TA requires interferon- γ and other proinflammatory cytokines such as Tumor Necrosis Factor (TNF)^{5,6}. However, the precise pathogenesis of transplant arteriosclerosis is not fully understood.

Notch signaling pathway regulates a broad array of cell fates and cellular processes during embryonic development and contributes to adult homeostasis. Notch proteins comprise a family of transmembrane receptors and ligands highly conserved through Evolution. In mammals, 4 Notch receptors (Notch1-4) and 5 Notch ligands (Dll1,-3,-4, Jag1-2) have been identified. The binding of ligands to Notch receptors results in a series of proteolytic cleavages of the receptor managed sequentially by ADAM proteins (a desintegrin and metalloproteinase) and the γ -secretase complex. Generation of the cytoplasmic Notch C-terminal intracellular fragment (NICD) is followed by its translocation into the nucleus and forms a complex with the transcriptional repressor CBF1/RBP-J κ . NICD binding to CBF1/RBP-J κ induces coactivators recruitment and allow the expression of various lineage-specific genes⁷.

Evidence that the Notch pathway plays a critical role in vascular development and homeostasis includes the specific expression of Notch pathway ligands and receptors in vascular EC and SMC, as well as the phenotypes of knock-out mice for several Notch components⁸. Expression analyses revealed that the major components of the Notch pathway in the vascular system consist of three ligands (Dll4, Jag1 and Jag2), three receptors (Notch-1, -3, and -4), and target family genes *Hes* and *Hey*⁹. Among Notch receptors, only Notch4 displays an expression pattern restricted to endothelium¹⁰. Combined deletion of *Notch1* and *Notch4* genes enhance the defects in vasculature remodeling observed in Notch1 single knock-out mice¹¹. EC-specific expression of an activated form of Notch4 led to embryonic lethality with abnormal vessel structure and patterning¹². Constitutive activation of Notch4 in EC also causes defects in vascular remodeling¹³. In vitro experiments also demonstrate that Notch4 activation protects EC from apoptosis, promotes endothelial-to-mesenchymal trans-differentiation and blocks both proliferation and angiogenesis¹⁴⁻¹⁷.

Although the importance of Notch in controlling EC proliferation, differentiation and survival has been established, little is known about the role of Notch expressed in allografted vessels during the development of transplant arteriosclerosis. This study investigated expression of Notch receptors in a fully MHC mismatched rat cardiac allograft combination that elicits TA and further examined regulation of Notch signaling by silencing Notch4 and Hes1 in cultured vascular EC. Taken together, our findings indicate that impaired Notch4 activity elicits TA by triggering EC activation and apoptosis.

Methods

Detailed Methods are available online at <http://atvb.ahajournals.org>.

Cardiac allografts

Rats heterotopic cardiac allografts were performed with fully mismatched LEW.1W (RT1u) or LEW.1A (RT1a) as donors and LEW.1A as recipients (Centre d'Elevage Janvier). Recipients underwent either a donor-specific blood transfusion (DST) 7 and 14 days before transplantation or a 20-day course of the deoxyspergualin analog LF015-095. At day 100 post-transplantation, clear-cut histological signs of TA were found in DST-treated animals whereas LF015-095-treated animals tolerated the graft without any signs of TA. Rat cellular subsets were isolated from Lewis Rats.

Cell culture

Primary cultures of human arterial EC (HAEC) and Human Umbilical Vein EC (HUVEC) were isolated and grown in ECBM with 10% fetal calf serum and supplement kit (Promocell).

Transfections, CBF1-luciferase reporter assay and siRNAs

The luciferase reporter plasmid that contains 4 copies of a binding site for CBF1 (CBF1-Luc) was transfected in HUVEC with lipofectamine reagent (Invitrogen). For the positive control, cells were also transfected with a plasmid encoding Notch2 NICD. siRNA duplexes purchased from Ambion were transfected with RNAiMAX lipofectamine reagent (Invitrogen).

qRT-PCR, Western blot, Immuno-Histochemistry (IHC) analysis and Flow Cytometry

Please see the supplemental data section, available online at <http://atvb.ahajournals.org>, for additional details.

Scratch Assay & Time Lapse

Confluent cell layers were scratched with a 20µl micro-pipette tip and subjected for time-lapse video microscopy for 24h in complete culture medium.

Cell Viability and Apoptosis Assays

MTT assay – HAEC were incubated with MTT for 4h. After DMSO addition, OD for each condition was measured at 570nm.

AnnexinV staining - EC were stained with APC-annexinV (BD Biosciences). Fluorescence was measured using a FACScalibur® (BD Biosciences) and analyzed using FlowJo® software (Tree Star, Inc).

Statistics

Presented data are representative for at least 3 independent experiments. Results are means \pm SE.

Statistical analysis was performed by the parametric analysis of variance test. $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

Down-regulation of the Notch Pathway upon Transplant Arteriosclerosis

Firstly, expression of Notch receptors was examined in cardiac allograft at D100 post-transplantation. In this experimental model, donor-specific blood transfusions (DST) before transplantation allows long-term survival (>100 days) associated with TA while graft tolerance (TOL) is induced by a short-term treatment with a deoxyspergualine analogue (LF15-0195)^{18, 19}. Among Notch receptors, Notch2, Notch3 and Notch4 transcripts levels were markedly down-regulated in TA allografts compared to TOL (13.3-, 53.8- and 2.9-fold decrease, respectively) and to syngeneic controls (A/A) (Figure1). No significant change in Notch1 was observed. TA also correlates with a significant increase in adhesion molecule VCAM-1 expression suggesting that TA is associated with both an altered Notch signaling and EC dysfunction. Importantly, Notch4 expression assessed by western blotting was reduced in the TA compared to TOL and syngeneic controls (Figure1B). Quantification revealed that Notch4 expression was reduced by 55% in TA compared with syngeneic transplants (Figure1C). Among Notch receptors, only Notch4 was reported as an endothelial-restricted molecule¹⁰. We observed that Notch4 immunoreactivity was confined to the endothelial cell layer (mostly in arteries) in cardiac sections and overlap with PECAM-1 immunoreactivity. Immunohistological staining of Notch4 in allografts attested endothelial Notch4 decrease in arteries for both early and late arteriosclerotic lesions (Figure1D). Moreover, analysis in rat cell subsets (EC, B-cells, T-cells, NK cells, macrophages, DC: both resting and activated) confirmed that Notch4 was mostly expressed by EC (see supplemental FigureI).

Notch4 Expression is decreased in Vascular EC by Inflammatory Cytokines Implicated in the Pathogenesis of TA

Consequently, the role of the endothelial Notch4 signaling in arterial injury and remodeling, was further investigated in cultured human vascular EC. To develop a relevant *in vitro* model, we sought to characterize the pattern of inflammatory soluble mediators potentially implicated in the regulation of Notch pathway associated with TA^{20,21}. We showed that TNF, TGF β and IL10 expression was markedly increased in allografts with TA at D100 post-transplantation (2.5-, 3.6- and 34.0-fold as compared to syngeneic controls, respectively). No significant change was observed at D100 in tolerant allografts (data not shown). Next, cultures of arterial EC were treated with recombinant human TNF, TGF β , IL10 for various period of time. Notch4 expression was then analyzed by and Western blotting. As shown in Figure2B, TNF, TGF β and IL10 induced a strong, time-dependant, decrease in Notch4 expression. Moreover, TGF β and IL10 displayed a major effect at 24h, while TNF has a maximal effect on Notch4 at 12h that is persistent up to 72h (Figure2C). Western blotting analysis showed no significant change in Notch1 in endothelial cells stimulated with TNF for 2-24h (Figure2D), suggesting that Notch1 expression does not compensate for the loss of Notch4 in response to TNF.

Thus soluble mediators of inflammation implicated in TA directly affect Notch signaling pathway by decreasing endothelial Notch4 expression.

Endothelial Decrease in Notch4 is Associated with Canonical Notch Activity Reduction

Canonical Notch activity allowing expression of *Hes/Hey* effector genes in a CBF1 dependent manner may be the resultant of the combined Notch activation pattern⁹. To test whether decrease in Notch4 expression by pro-inflammatory mediators of TA in EC reflects a global decrease in Notch activity, EC have been transfected with a luciferase reporter plasmid that contains 4 copies of a binding site for CBF1 (4xwtCBF1-Luc) and then treated with TNF. Figure3A shows that TNF significantly decreases CBF1 promoter activity in EC at 12h and provides a maximal inhibition at 24h (66±18% and 94±6% of decrease, respectively). EC cotransfected with both CBF1/luciferase construct and a Notch2 NICD plasmid (N2IC/MSCV)²² were used as a positive control demonstrating that NICD promotes CBF1/luciferase activity in our conditions. Our findings also indicates that resting EC display a constitutive Notch activity. To validate this observation, EC were treated with DAPT, a specific γ -secretase inhibitor²³. We found that DAPT display a dose-dependent decrease in CBF1/luciferase activity with a maximal inhibition achieved at 10 μ M (80±11% of inhibition versus untreated EC) (Figure 3B) confirming that inhibition of γ -secretase efficiently abrogates Notch basal activity in resting EC. Notch pathway activity can also be assessed by measuring *Hes/Hey* gene transcription⁹. To confirm our results obtained with the CBF1 reporter assay, we further analyzed transcript level for *Hes1* gene in EC treated with TNF. In Figure3C, decrease in basal Notch4 expression in response to TNF was also associated with a progressive and strong decrease of Hes1 mRNA level. Our results also show that regulation of Notch4 expression and overall Notch activity in EC by TNF were both dependent of NF κ B (see supplemental FigureII).

Silencing of Notch4 in EC is sufficient to impair Notch activity in EC

Parallel regulations for Notch4 expression and Notch activity by TNF strongly suggest that Notch4 could be responsible for the global Notch activity in EC. To address this point, EC were transiently transfected with two sets of siRNA specifically targeting Notch4. Knock-down was achieved and attested by qRT-PCR (95.3±1.7% and 74.4±6.9% decrease in mRNA level for Notch4 siRNA#1 and #2, respectively, as compared to scramble siRNA control) without affecting other Notch receptors (figure4A and supplemental figureIII). To test whether Notch4 inhibition impacts the overall Notch activity, silenced EC were either collected to measure Hes1 expression or CBF1 activity after transfection of the CBF1 reporter construct. As shown in figure4B, Notch4 silencing by both siRNA duplexes efficiently down-regulates Hes1 expression (73.0±0.8% and 58.3±3.2% for si#1 and si#2, respectively, as compared to scramble siRNA). CBF1-reporter assay indicated that Notch activity was

severely impaired following Notch4 siRNA transfection ($97.9\pm 1.0\%$ and $75.6\pm 1.0\%$ for si#1 and si#2, respectively, as compared to the scramble siRNA), suggesting that in EC, Notch activity directly relies on Notch4 expression (figure4C).

Silencing of Notch4 and Hes1 promotes EC activation and apoptosis

Silencing targeting Notch4 or Hes1 was performed to determine how decrease in Notch4 and Hes1 expression by inflammatory cytokines could elicit EC dysfunction. Firstly, the impact of siRNA-mediated knockdown of Notch4 and Hes1 on EC phenotype was examined by flow cytometry (Figure5A). Our data show that in the absence of TNF, Notch4 and Hes1 knockdown significantly induce VCAM-1 expression in EC (2.0- and 1.6-fold increase *versus* scramble, for Notch4 and Hes1, respectively). De novo expression of E-selectin was also observed (data not shown). In addition, while TNF efficiently induces VCAM-1 expression concomitant silencing of either Notch4 or Hes1 further enhances VCAM-1 expression (3.5- and 2.8-fold increase, as compared to scramble siRNA). A metabolic viability assay indicates that Notch4 and Hes1 silencing dramatically decreases cell viability ($31.8\pm 1.2\%$ and $34.2\pm 3.5\%$ for Notch4 and Hes1 knockdown as compared to controls, respectively) (Figure5B). Results were confirmed by DNA content analyses (data not shown). As shown in Figure5C, inhibition of Notch4 and Hes1 expression strongly increases the frequency of AnnexinV positive cells (6.8- and 6.0-fold increase, respectively) indicating that EC death results from apoptosis.

Silencing of Notch4 and Hes1 inhibits repair of endothelial injury

EC apoptosis triggers vascular remodeling that ultimately could leads to TA^{1,4}. Cell migration and proliferation are key processes controlling vascular remodeling. Thus we used a more integrative model to test whether Notch4 could play a role in endothelial monolayer repair after injury. To this aim, EC monolayers were wounded 24h after siRNA transfection and wound healing was monitored by time-lapse imaging for 24h. Representative phase contrast micrographs illustrating repair of endothelial injuries are shown in Figure5D. Wound area was calculated to allow wound closure quantification. Equal wound closure motility was observed for EC transfected without siRNA (NT) or with scramble siRNA. In contrast, wound healing capacity of cells transfected by siRNA duplexes targeting either Notch4 or Hes1 was impaired by $22.5\pm 2.1\%$ and $27.0\pm 1.3\%$ compared to scramble control, respectively.

Discussion

The precise pathogenesis of graft arteriosclerosis is unknown^{1,2,4}. Given the role of Notch signaling in vascular morphogenesis and remodeling⁸, we speculate that a better understanding of Notch function in transplant vascular injury might lead to development of new therapeutic and/or diagnostic strategies.

In the present study, we demonstrated that allograft accelerated-transplant arteriosclerosis associates with a specific pattern of expression for Notch receptors. Decrease in Notch2, 3 and 4 features TA at D100 after cardiac transplantation and correlates with an increased level of VCAM-1 expression, an adhesion molecule mainly expressed on vascular EC. Moreover, TA also correlates with high levels of pro-inflammatory cytokines including TNF, TGF β and IL10 as previously reported^{5,20}. In contrast, no significant changes in Notch receptors were found in long-term surviving (i.e. tolerant) allografts without TA as compared to syngeneic controls.

The vascular endothelium expresses all four Notch receptors but only Notch4 displays an almost exclusively endothelial expression pattern whereas Notch1-3 are expressed more broadly¹⁰. Therefore, we speculate that regulation of Notch4 in EC may play a role in vascular lesions and remodeling that trigger TA. Decrease in Notch4 was consistently obtained in cultured EC in response to TNF, TGF β and IL10, pointing out a functional relevance of Notch signaling in inflammatory processes. Notch activation also occurs in macrophages upon inflammation and Notch components are present within macrophages in atherosclerotic plaques²⁴. Differential Notch4 regulation has been reported according to vascular sites and development stages that might reflect specific signaling mediated by cytokines and growth factors. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and fibroblast growth factor (FGF-2) modestly increase Notch1 and Notch4 mRNA in human umbilical vein EC (HUVEC)¹⁴. Cerivastatin, an anti-angiogenic factor, downregulates Notch4 mRNA in FGF-2-treated EC²⁵. TNF induces Notch4 mRNA in arthritic, but not normal, synovial fibroblasts, however, mechanisms underlying transcription of Notch4 remain largely unknown²⁶. Whether partial loss of EC and their associated Notch4 molecules in arteriosclerosis lesions could also account for the observed decreased Notch4 levels observed in TA, in addition to the down regulation of EC Notch4 mRNA expression via exposure to inflammatory cytokines, could not be excluded. However, this hypothesis is not fully supported by immunohistochemistry showing sustained PECAM-1 immunoreactivity in TA (Figure 1D).

We have used two readouts to demonstrate a basal and significant activity of Notch pathway in quiescent EC. The decreased activity of CBF1 reporter assay in response to a γ -secretase inhibitor (DAPT) and the constitutive expression of effector target gene *Hes1* both indicate that Notch pathway is basally activated in quiescent EC monolayers as also suggested by previous studies²⁷. Importantly, our findings further demonstrate that TNF provides a time-dependent decrease in Notch activity

reflected by both a reduced CBF1 reporter gene activity and a decrease in Hes1 level. Thus, an inhibition of Notch activity parallels the down regulation of Notch4 expression mediated by TNF in EC.

A similar decrease in Hes1 transcription in response to TNF has been reported previously in fibroblast and epithelial cell lines²⁸. Interestingly, NF κ B activation was shown to enhance constitutive Hes1 expression in early time points but did not alter late (>1h) TNF-dependant repression of Hes1 transcription²⁸. Using chemical inhibitors PDTC and NAC, we established that concomitant suppression of Notch4 and Notch activity by TNF after 24h were both dependant on NF κ B pathway, suggesting that decrease in global Notch activity rely on Notch4 expression rather than a direct NF κ B-dependent mechanism.

While our data confirm a role for inflammatory cytokines in the regulation of Notch pathway they also address the mechanism by which regulation of Notch signaling may affect EC functions. EC are a common cellular target of all initiating events (allo-immune response, inflammation, and immunosuppressive drug cytotoxicity) implicated in TA development. Resultant chronic EC activation, apoptosis and injury may play a pivotal role in vascular remodeling^{1,4}. We found that blockade of Notch4 elicits EC activation reflected by the induction of VCAM-1, and to a lesser extend E-selectin (not shown), expression on cell surface. The recruitment of inflammatory cells into allografts requires adhesion to activated vascular cells and endothelial expression of several adhesion molecules (eg, intercellular adhesion molecule ICAM-1, VCAM-1, E/P-selectin) correlates with both acute rejection and TA²⁹. We demonstrate that Notch signaling also controls adhesion molecules, at least VCAM-1 and E-selectin, expressed in allografted vessels that are critical in mediating leukocyte adhesion and infiltration but also in mediating SMC migration both events that trigger arteriosclerotic lesions³⁰. By activating but also drastically enhancing EC activation upon TNF treatment, decreased Notch signaling could greatly contribute to the maintenance of EC dysfunction within the graft that promote vascular remodeling and ultimately graft failure⁴.

In EC, constitutive expression of the active domain (NICD) of Notch4 blocks cell cycle and protects from apoptosis^{15,16,31}. Consistent with these data, silencing Notch4 promotes cell death and impairs injury repair processes without any visible effect on proliferation (data not shown). Notch activity blockade through Hes1 knockdown showed similar effect, indicating that Notch4 functions were mediated by Hes1. Our data are consistent with approaches targeting Notch signaling by the use of γ -secretase inhibitors which showed impaired wound healing process in keratinocytes or fibroblasts³² and cell apoptosis induction in Kaposi sarcoma³³ or in multiple myeloma³⁴. Surprisingly, as Notch signaling has so far been implicated in the regulation of sprouting angiogenesis and arterio-venous differentiation, but no effects on endothelial viability have been observed in Notch deficient mice. Endothelial-specific Notch1^{-/-} mice exhibit a similar phenotype to global Notch1^{-/-} mice, suggesting that endothelial Notch1 is critical for embryonic vascular development and viability³⁵. In

contrast, Notch4^{-/-} mice are viable without any observable vascular defects. However, Notch1^{-/-}/Notch4^{-/-} mice exhibit a more severe vascular phenotype than Notch1^{-/-} mice, suggesting that Notch1 and Notch4 may have overlapping roles in vascular remodeling and morphogenesis during development¹¹. The role of Notch1 and Notch4 signaling in postnatal vascular angiogenesis and remodeling remains however to be determined.

In addition to cell death, we demonstrate that Notch signaling regulates EC dysfunction that plays a major role in many chronic inflammatory disorders as in TA.

In conclusion, we show here that Notch4 down-regulation during TA and in EC is associated with a global decrease in Notch activity. Notch4 down-regulation functionally results in EC dysfunction suggesting that Notch4 and basal Notch activity are required to maintain EC quiescence and for optimal survival and repair in response to injury. Overall, we also show that regulation of Notch4 alone had substantial effects, suggesting that it is one of the main Notch receptor in vascular endothelium.

Disclosures

None

Acknowledgements

The authors thank Philippe Hulin and the “confocal microscopy and cellular imaging platform” of IFR26 for time lapse study. This work was supported by “Xenome”, a European Commission-funded Integrated Project, Life Sciences, Genomics and Biotechnology for Health LSHB-CT-2006-037377, and by fellowships from La Société Francophone de Transplantation, La Société de Néphrologie and La Fondation Progreffe. Quillard T was supported by a grant from la Fondation pour la Recherche Médicale.

References

1. Mitchell RN, Libby P. Vascular remodeling in transplant vasculopathy. *Circ Res.* 2007;100:967-978.
2. Libby P, Pober JS. Chronic rejection. *Immunity.* 2001;14:387-397.
3. Sasaki Y, Suehiro S, Becker AE, Kinoshita H, Ueda M. Role of endothelial cell denudation and smooth muscle cell dedifferentiation in neointimal formation of human vein grafts after coronary artery bypass grafting: therapeutic implications. *Heart.* 2000;83:69-75.
4. Cailhier JF, Laplante P, Hebert MJ. Endothelial apoptosis and chronic transplant vasculopathy: recent results, novel mechanisms. *Am J Transplant.* 2006;6:247-253.
5. Suzuki J, Cole SE, Batirel S, Kosuge H, Shimizu K, Isobe M, Libby P, Mitchell RN. Tumor necrosis factor receptor -1 and -2 double deficiency reduces graft arterial disease in murine cardiac allografts. *Am J Transplant.* 2003;3:968-976.
6. Tellides G, Pober JS. Interferon-gamma axis in graft arteriosclerosis. *Circ Res.* 2007;100:622-632.
7. Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science.* 1999;284:770-776.
8. Iso T, Hamamori Y, Kedes L. Notch signaling in vascular development. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23:543-553.
9. Iso T, Kedes L, Hamamori Y. HES and HERP families: multiple effectors of the Notch signaling pathway. *J Cell Physiol.* 2003;194:237-255.
10. Uyttendaele H, Marazzi G, Wu G, Yan Q, Sassoon D, Kitajewski J. Notch4/int-3, a mammary proto-oncogene, is an endothelial cell-specific mammalian Notch gene. *Development (Cambridge, England).* 1996;122:2251-2259.
11. Krebs LT, Xue Y, Norton CR, Shutter JR, Maguire M, Sundberg JP, Gallahan D, Closson V, Kitajewski J, Callahan R, Smith GH, Stark KL, Gridley T. Notch signaling is essential for vascular morphogenesis in mice. *Genes Dev.* 2000;14:1343-1352.
12. Uyttendaele H, Ho J, Rossant J, Kitajewski J. Vascular patterning defects associated with expression of activated Notch4 in embryonic endothelium. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98:5643-5648.
13. Carlson TR, Yan Y, Wu X, Lam MT, Tang GL, Beverly LJ, Messina LM, Capobianco AJ, Werb Z, Wang R. Endothelial expression of constitutively active Notch4 elicits reversible arteriovenous malformations in adult mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102:9884-9889.
14. Liu ZJ, Shirakawa T, Li Y, Soma A, Oka M, Dotto GP, Fairman RM, Velazquez OC, Herlyn M. Regulation of Notch1 and Dll4 by vascular endothelial growth factor in arterial endothelial cells: implications for modulating arteriogenesis and angiogenesis. *Mol Cell Biol.* 2003;23:14-25.
15. MacKenzie F, Duriez P, Wong F, Nosedá M, Karsan A. Notch4 inhibits endothelial apoptosis via RBP-Jkappa-dependent and -independent pathways. *J Biol Chem.* 2004;279:11657-11663.
16. Nosedá M, Chang L, McLean G, Grim JE, Clurman BE, Smith LL, Karsan A. Notch activation induces endothelial cell cycle arrest and participates in contact inhibition: role of p21Cip1 repression. *Mol Cell Biol.* 2004;24:8813-8822.
17. Nosedá M, McLean G, Niessen K, Chang L, Pollet I, Montpetit R, Shahidi R, Dorovini-Zis K, Li L, Beckstead B, Durand RE, Hoodless PA, Karsan A. Notch activation results in phenotypic and functional changes consistent with endothelial-to-mesenchymal transformation. *Circ Res.* 2004;94:910-917.

18. Chiffolleau E, Beriou G, Dutartre P, Usal C, Soulillou JP, Cuturi MC. Induction of donor-specific allograft tolerance by short-term treatment with LF15-0195 after transplantation. Evidence for a direct effect on T-cell differentiation. *Am J Transplant.* 2002;2:745-757.
19. Heslan JM, Renaudin K, Thebault P, Josien R, Cuturi MC, Chiffolleau E. New evidence for a role of allograft accommodation in long-term tolerance. *Transplantation.* 2006;82:1185-1193.
20. Furukawa Y, Becker G, Stinn JL, Shimizu K, Libby P, Mitchell RN. Interleukin-10 (IL-10) augments allograft arterial disease: paradoxical effects of IL-10 in vivo. *Am J Pathol.* 1999;155:1929-1939.
21. Lattmann T, Hein M, Horber S, Ortmann J, Teixeira MM, Souza DG, Haas E, Tornillo L, Munter K, Vetter W, Barton M. Activation of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in host organs during chronic allograft rejection: role of endothelin receptor signaling. *Am J Transplant.* 2005;5:1042-1049.
22. Witt CM, Hurez V, Swindle CS, Hamada Y, Klug CA. Activated Notch2 potentiates CD8 lineage maturation and promotes the selective development of B1 B cells. *Mol Cell Biol.* 2003;23:8637-8650.
23. Micchelli CA, Esler WP, Kimberly WT, Jack C, Berezovska O, Kornilova A, Hyman BT, Perrimon N, Wolfe MS. Gamma-secretase/presenilin inhibitors for Alzheimer's disease phenocopy Notch mutations in *Drosophila*. *FASEB J.* 2003;17:79-81.
24. Fung E, Tang SM, Canner JP, Morishige K, Arboleda-Velasquez JF, Cardoso AA, Carlesso N, Aster JC, Aikawa M. Delta-like 4 induces notch signaling in macrophages: implications for inflammation. *Circulation.* 2007;115:2948-2956.
25. Vincent L, Albanese P, Bompais H, Uzan G, Vannier JP, Steg PG, Soria J, Soria C. Insights in the molecular mechanisms of the anti-angiogenic effect of an inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *Thromb Haemost.* 2003;89:530-537.
26. Ando K, Kanazawa S, Tetsuka T, Ohta S, Jiang X, Tada T, Kobayashi M, Matsui N, Okamoto T. Induction of Notch signaling by tumor necrosis factor in rheumatoid synovial fibroblasts. *Oncogene.* 2003;22:7796-7803.
27. Taylor KL, Henderson AM, Hughes CC. Notch activation during endothelial cell network formation in vitro targets the basic HLH transcription factor HESR-1 and downregulates VEGFR-2/KDR expression. *Microvasc Res.* 2002;64:372-383.
28. Espinosa L, Ingles-Esteve J, Robert-Moreno A, Bigas A. I κ B α and p65 regulate the cytoplasmic shuttling of nuclear corepressors: cross-talk between Notch and NF κ B pathways. *Mol Biol Cell.* 2003;14:491-502.
29. Ardehali A, Laks H, Drinkwater DC, Ziv E, Drake TA. Vascular cell adhesion molecule-1 is induced on vascular endothelia and medial smooth muscle cells in experimental cardiac allograft vasculopathy. *Circulation.* 1995;92:450-456.
30. Moiseeva EP. Adhesion receptors of vascular smooth muscle cells and their functions. *Cardiovasc Res.* 2001;52:372-386.
31. Leong KG, Hu X, Li L, Nosedá M, Larrivee B, Hull C, Hood L, Wong F, Karsan A. Activated Notch4 inhibits angiogenesis: role of beta 1-integrin activation. *Mol Cell Biol.* 2002;22:2830-2841.
32. Chigurupati S, Arumugam TV, Son TG, Lathia JD, Jameel S, Mughal MR, Tang SC, Jo DG, Camandola S, Giunta M, Rakova I, McDonnell N, Miele L, Mattson MP, Poosala S. Involvement of notch signaling in wound healing. *PLoS ONE.* 2007;2:e1167.
33. Curry CL, Reed LL, Golde TE, Miele L, Nickoloff BJ, Foreman KE. Gamma secretase inhibitor blocks Notch activation and induces apoptosis in Kaposi's sarcoma tumor cells. *Oncogene.* 2005;24:6333-6344.

34. Nefedova Y, Sullivan DM, Bolick SC, Dalton WS, Gabrilovich DI. Inhibition of Notch signaling induces apoptosis of myeloma cells and enhances sensitivity to chemotherapy. *Blood*. 2008;111:2220-2229.
35. Limbourg FP, Takeshita K, Radtke F, Bronson RT, Chin MT, Liao JK. Essential role of endothelial Notch1 in angiogenesis. *Circulation*. 2005;111:1826-1832.

Figure Legends

Figure 1

Expression of Notch receptors in cardiac allografts. (A) qRT-PCR for Notch1-4 and VCAM-1 was performed on cardiac allografts at D100 post-transplantation. Allograft (W/A) recipients were treated with DST (TA) or with LF015-095 (TOL) (n=4) (arbitrary units). (B) A representative western blot and (C) quantification of Notch4 immunoreactivity in cardiac syngeneic (A/A), TA and TOL allogeneic (W/A) transplants (arbitrary units) (*p<0.05 versus A/A and †p<0.05 for TA versus TOL). (D) Immunohistochemistry of heart sections from allografts (W/A, TOL and TA) and syngeneic controls (A/A) for Notch4 and PECAM-1.

Figure 2

Regulation of Notch4 in EC upon TA-related cytokines stimulation. (A) Expression of TNF, TGFβ and IL10 was quantified by qRT-PCR in cardiac allografts with TA (W/A-TA) versus syngeneic controls (A/A) (n=4) (arbitrary units) (*p<0.05 versus A/A). (B) Notch4 protein expression was determined by western blot in TNF, TGFβ or IL10-treated HAEC and quantified after normalization to GAPDH (arbitrary units) (*p<0.05 versus control). (C) Time course analysis by qRT-PCR of Notch4 in HAEC in response to TNF (*p<0.05 versus control). (D) Western blot for Notch1 and VCAM-1 protein levels in primary HAEC treated with TNF.

Figure 3

Notch activity in vascular EC after TNF treatment. (A) HUVEC were transfected with a CBF1/luciferase reporter plasmid and then treated with TNF or DAPT (B). Co-transfection with a plasmid encoding the intracellular domain of Notch2 (N2NICD) was used as a positive control. Results shown are means of 4 independent experiments (arbitrary units). (C) qRT-PCR for Hes1 was performed from HAEC activated with TNF (*p<0.05 versus control).

Figure 4

Notch4 knock-down associates with a decrease in Notch activity. EC were transiently transduced with specific siRNAs targeting Notch4. Notch4 (A) and Hes1(C) expression were analyzed by qRT-

PCR. **(B)** Notch activity was studied in HUVEC transduced with CBF1-Luc reporter construct after siRNA transduction (arbitrary units) (*p<0.05 versus scramble control).

Figure 5

Effect of Notch4 and Hes1 siRNA on EC activation, apoptosis and wound repair.

(A) VCAM-1 induction analyzed by Facs after activation with or without TNF. **(B)** EC viability was quantified using an MTT assay. **(C)** Cell Apoptosis study was managed by Facs after staining with AnnexinV. **(D)** siRNA-transduced EC were subjected to scratch assay. Wound closure was followed for 24h by time lapse imaging (*p < 0.05 versus scramble control).

FIGURE 1

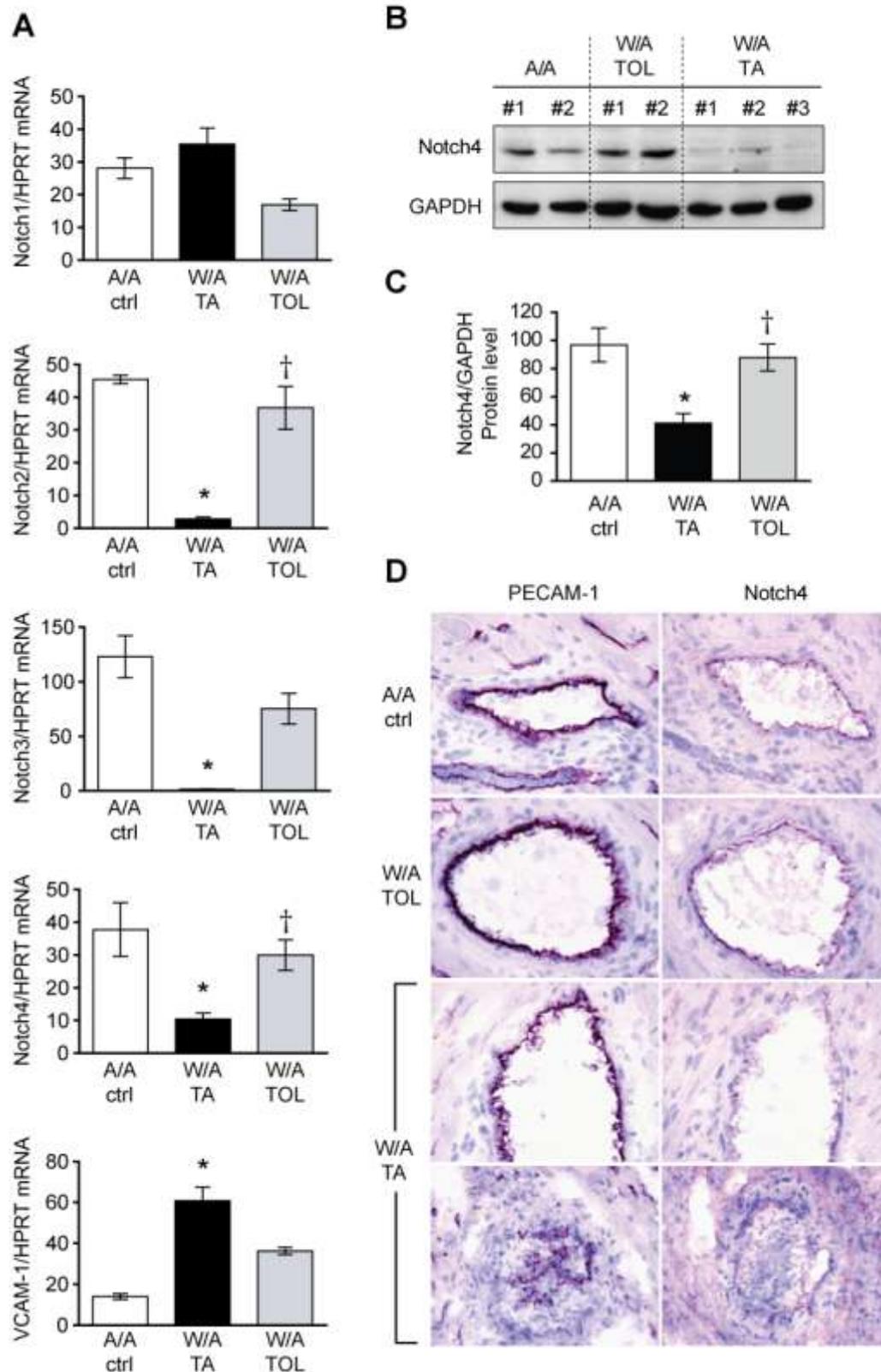


FIGURE 2

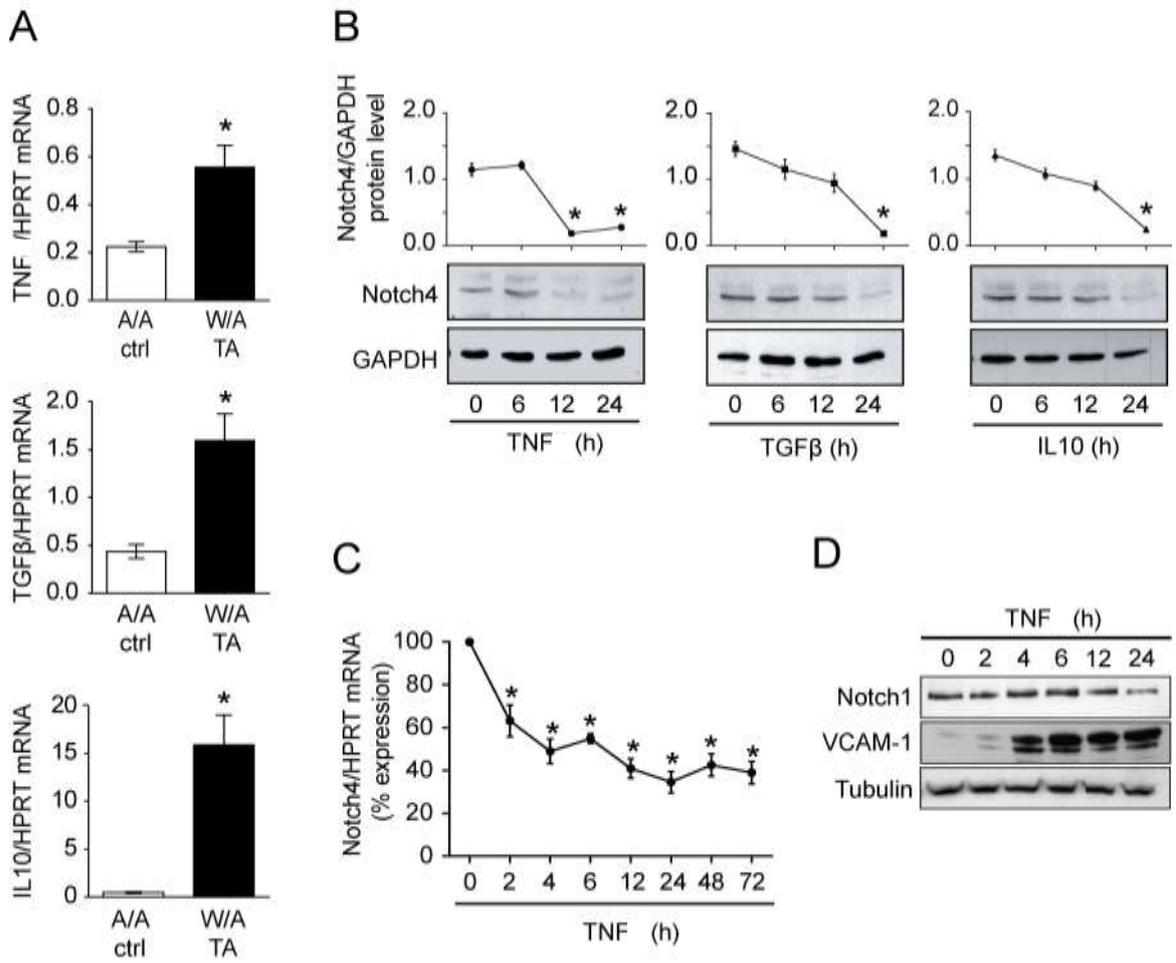


FIGURE 3

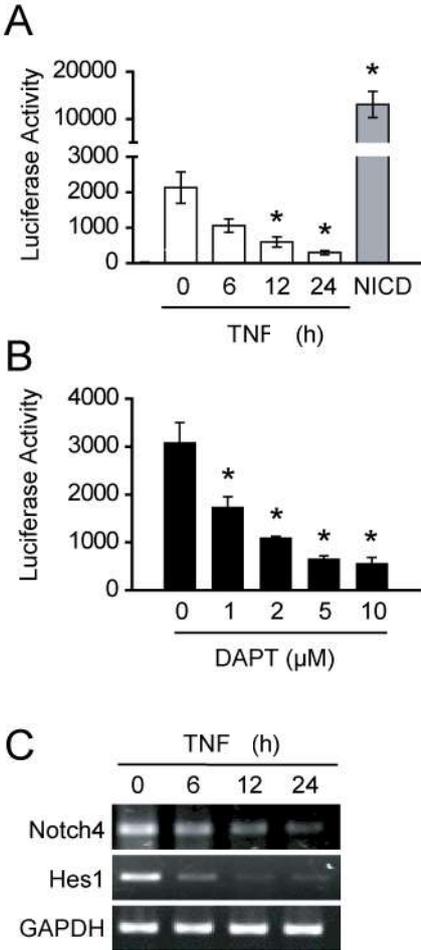


FIGURE 4

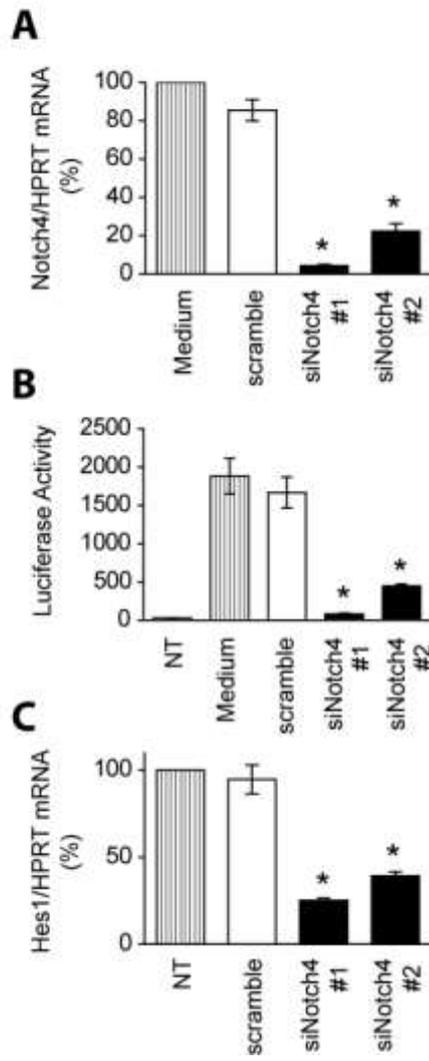
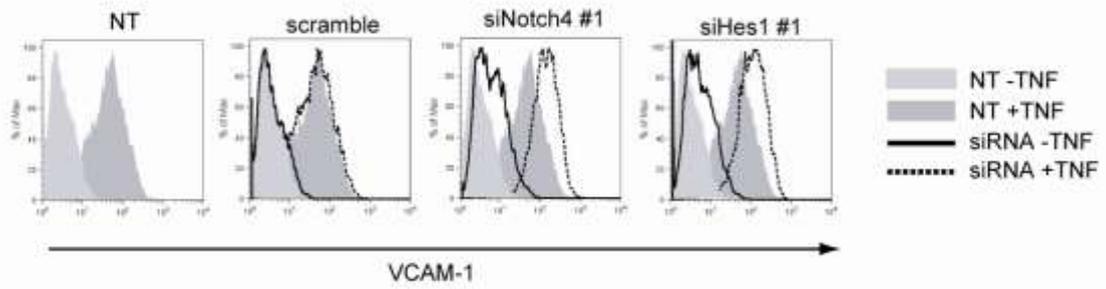
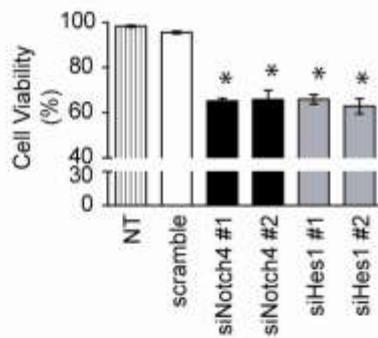


FIGURE 5

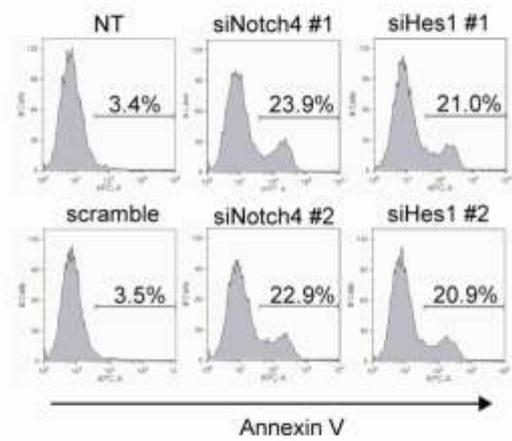
A



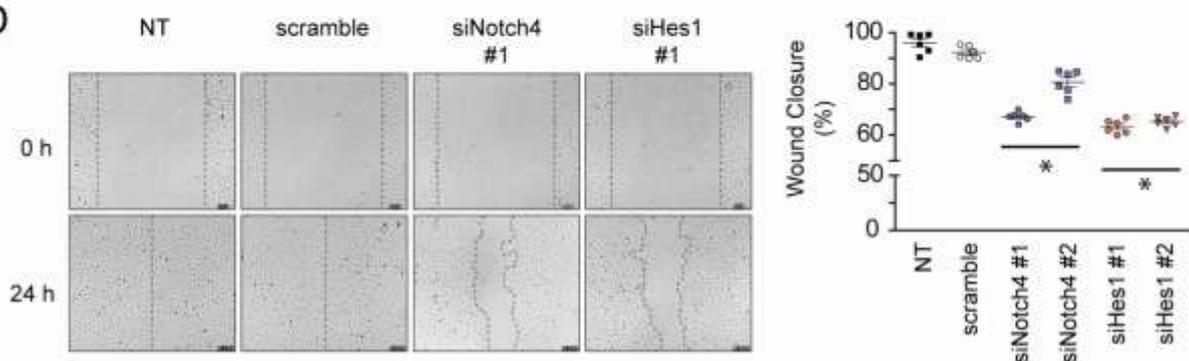
B



C



D



Supplement data for “Impaired Notch4 activity elicits Endothelial Cells Activation and Apoptosis: Implication for Transplant Arteriosclerosis” by Quillard T. *et al.*

Supplemental Methods

Animal model of Transplant Arteriosclerosis

Rats heterotopic cardiac allografts were performed as previously described with fully MHC mismatched LEW.1W (RT1^u) or syngeneic LEW.1A (RT1^a) as transplant donors and LEW.1A as recipients (Centre d'Elevage Janvier, Genest-Saint-Isle, France) ¹. Recipients underwent either a donor-specific blood transfusion (DST) 7 and 14 days before transplantation (n=4) or a 20-day course of the deoxyspergualin analog LF015-095 (n=4). At day 100 post-transplantation, clear-cut histological signs of transplant arteriosclerosis (TA) were found in DST-treated animals whereas LF015-095-treated animals tolerated the graft without any signs of TA ^{1, 2}. Graft survival was evaluated by palpation through the abdominal wall. Studies described here have been performed in accordance with the institutional guidelines of the INSERM. Messenger RNA and proteins extraction and Immuno-histological stainings were performed on entire grafts 100 days post-transplantation.

Rat cellular subsets were isolated from LEWIS rat as following. EC of LEW.1A origin were isolated and cultured as previously described ³. Total CD103+ DCs were selected and stimulated with CD40L for 6h as previously described ⁴. B cells (TCR- CD4- CD45R+) and NK cells (TCR- CMHII^{high}-CD8+/CD161a+high) were respectively purified from mononuclear spleen cells by FACS Aria flow cytometer (Bd Bioscience, Franklin Lakes, NJ, USA). The resultant purity of sorted cells was >95%. NK cells were activated with PMA (10 ng/ml) and ionomycin (1µg/ml) for 5h. T cells (His42⁻ OX42⁻) were obtained after negative selection with anti-mouse IgG-coated magnetic beads (Dyna, Oslo, Norway). LT were stimulated with anti-CD3 (0.75µg/mL) and with addition of soluble anti-CD28 (0.6µg/mL). Purity was routinely >95%. NR8383 Macrophages cell line was activated with LPS (1µg/ml) for 24h (Sigma–Aldrich).

Cell culture and reagents

Primary EC cultures from human artery (HAEC) and umbilical vein (HUVEC) were isolated and grown in endothelial basal growth medium (ECBM, Promocell, Heidelberg, Germany) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), 0.004ml/ml EC growth supplement/heparin, 0.1 ng/mL human epidermal growth factor, 1ng/mL human basic fibroblast growth factor, 1µg/mL hydrocortisone, 50µg/mL gentamicin, and 50ng/mL amphotericin B (Promocell, Heidelberg, Germany), 2mM L-glutamine, 100U/ml penicillin, 0.1mg/ml streptomycin (Sigma-Aldrich). Confluent EC monolayers were deprived for 6 to 12h in ECBM with 2% FCS, 2mM L-glutamine, 100U/ml penicillin, 0.1mg/ml streptomycin before incubated with Human Recombinant TNF (100U/ml, provided by Professor P.

Neuman, BASF, BASF Ludwigshafen, Germany), TGF β or IL10 (2ng/ml) (R&D Systems, Abingdon, UK). For inhibition experiments, cells were pretreated for 1h with PDTC (pyrrolidine dithiocarbamate, 100 μ M) or NAC (N-Acetyl-Cysteine, 10mM) (Sigma–Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) before TNF treatment for 24h.

Plasmids, siRNA transfection and CBF1-luciferase reporter assay

The luciferase reporter plasmid that contains 4 copies of a binding site for CBF1 (CBF1-Luc) was a kind gift from Dr. Diane Hayward (Johns Hopkins University, Baltimore, Maryland, USA)⁵. Cells were co-transfected with the N2IC/MSCV plasmid encoding Notch2 NICD kindly provided by Dr Christopher A. Klug CA (University of Alabama at Birmingham, AL, USA) as a positive control for Notch activity⁶. HUVEC were transfected using the Lipofectamine reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and were incubated with TNF or DAPT (N-[N-(3,5-Difluorophenacetyl)-L-alanyl]-S-phenylglycine t-butyl ester, Sigma–Aldrich). Gene reporter activity was measured with the luciferase assay (Promega, Madison, WI, USA) and expressed as a relative luciferase activity after normalization to protein content.

For gene silencing, cells were transfected with RNAiMax lipofectamine® (Invitrogen) and siRNA targeting Notch4 (#107458, 95% knockdown, #107459, 74% knockdown), Hes1 (#114545, 73% knockdown, #114545, 78% knockdown) or a scrambled negative control (#AM4611) (Ambion, Austin, TX, USA) at a final concentration of 10nM. Specific expression knockdown by siRNA was attested by qRT-PCR and functional assays were assessed 48h post-transfection.

Quantitative real-time PCR

RNA was isolated using Trizol reagent (Invitrogen) and treated with Turbo DNase® (Ambion) before reverse transcription (RT). Quantitative PCR were performed using the ABI PRISM 7700 and 7900 sequence detection application program (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). For quantification, duplicates were normalized by the concomitant quantification of hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase (HPRT) and by an independent Rat or Human referent sample. Relative expression was calculated according to the 2- $\Delta\Delta$ Ct method, as previously described⁷. Custom primers for Hes1 (5'-AGAGGCGGCTAAGGTGTTTG-3', 5'-GAGAGGTGGGTTGGGGAGTT-3') and HPRT (5'-CCTTGGTCAAGCAGTACAGCC-3', 5'-TTCGCTGATGACACAAACATGA-3') were obtained from MWG (High Point, NC, USA) and used for qRT-PCR analysis. Primers and probes for the following genes were purchased from Applied Biosystems: Notch1 (Hs00413187_m1, Rn01758641_g1), Notch2 (Hs00225747_m1, Rn00577522_m1), Notch3 (Rn00571731_m1), Notch4 (Hs00270200_m1; Rn01525737_g1), VCAM-1 (Rn00563627_m1), TGF β (Rn00821748_g1), TNF (Rn99999017_m1), IL10 (Rn01483989_m1) and HPRT (H99999909_m1; Rn01527838_g1)

Western blot analysis

Cells were lysed on ice in 20mmol/L Tris-HCl (pH7.4), 137mmol/L NaCl, 0.05% Triton X-100, 1 mmol/L phenylmethylsulfonyl fluoride supplemented with Protease Inhibitors Cocktail containing 4-(2-aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride (AEBSF), E-64, bestatin, leupeptin, aprotinin, and sodium EDTA (PIC, Sigma–Aldrich). Cell lysates were resolved by SDS-PAGE (7.5%–10%) and subjected to Western immunoblot with antibodies for Notch4 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), Notch1 (Millipore, Billerica, MA, USA) and VCAM-1 (Santa Cruz Biotechnology), anti-GAPDH, anti-tubulin (Oncogene, MERCK EuroLab, Val de Fontenay, France) and secondary horseradish peroxidase-labeled (CST, St Quentin-en-Yveline, France; Serotec, Martinsried, Germany). Antibody-bound proteins were detected using an enhanced chemiluminescence kit (Amersham, Buckinghamshire, UK). Results shown are representative of at least 3 independent experiments.

Immunohisto-Chemistry

Rat tissues (hearts) were collected, embedded in Optimal Cutting Temperature compound (OCT Compound; Tissue Tek, Miles Laboratories, Elkhardt, IN, USA), immediately snap frozen in liquid nitrogen, and then stored at -80°C until use. Cryostat sections from entire grafts of $5\mu\text{m}$ were thawed, fixed in acetone (10 minutes at room temperature), and incubated overnight at 4°C with monoclonal mouse anti-Notch4 or anti-PECAM-1 (an endothelial cell marker, $5\mu\text{g/ml}$) mAb purchased from CST and Serotec, respectively. Sections were then labeled using a three-step indirect immuno-peroxidase technique with a biotin-conjugated anti-mouse Ab (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA), HRP-conjugated streptavidin (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA), visualized with VIP substrate (Vector Laboratories), and counterstained by incubation with hematoxylin and lithium chloride. Controls were performed using the blocking solution (PBS, 5% BSA, 5% normal donkey serum) in place of the primary antibodies. Sections were mounted in ProLong AntiFade Kit (Molecular Probes) and analyzed by microscopy.

Flow Cytometry

After transfection, HAEC were harvested and incubated with anti-human VCAM-1 ($10\mu\text{g/ml}$, R&D systems) then with a FITC-labeled polyclonal goat anti-mouse IgG F(ab')₂ antibody (Jackson Laboratories, West Grove, PA). Fluorescent labeling was measured on 10,000 cells/sample using a FACScalibur® (BD Biosciences) and analyzed with FlowJo® software (Tree Star, Inc., Ashland, OR, USA).

Scratch Assay & Time Lapse

Confluent cell layers were scratched with a 20µl micro-pipette tip, washed twice with PBS to remove cell debris and subjected for time-lapse video microscopy for 24h in complete culture medium. Phase contrast videos were taken using a computer-assisted microscope (Leica DMI6000B, Leica Microsystems SAS, Rueil Malmaison) equipped with an objective lens X5 (HCX FL Plan), and a CCD camera (Coolsnap HQ2, Photometrics Roper Scientifics SAS Evry). Results of all experiments were calculated as a ratio of cell-covered areas after 24h to initial scraped areas which did not differ significantly. Image acquisition and analysis were performed by using MetaMorph software (Universal Imaging, Media, PA).

Cell Viability and Apoptosis Assays

MTT assay - After 48h post-transfection, cells were washed with PBS and 1ml of MTT (Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide, 5mg/mL) was added to each well (Sigma Aldrich). After 4h at 37°C, Formazan crystals were solubilized in DMSO. OD for each condition was measured in triplicates at 570nm using a microplate reader (MRX, Dynatech laboratories, Chantilly VA, USA).

Annexin V staining- For apoptosis detection, EC were harvested, washed and resuspended in Binding Buffer (BD Bioscience) with annexinV-APC for 15min. Fluorescence was measured on 10,000 cells/sample using a FACScalibur® (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) and analyzed using FlowJo® software (Tree Star, Inc.). Results shown are representative of at least 3 independent experiments.

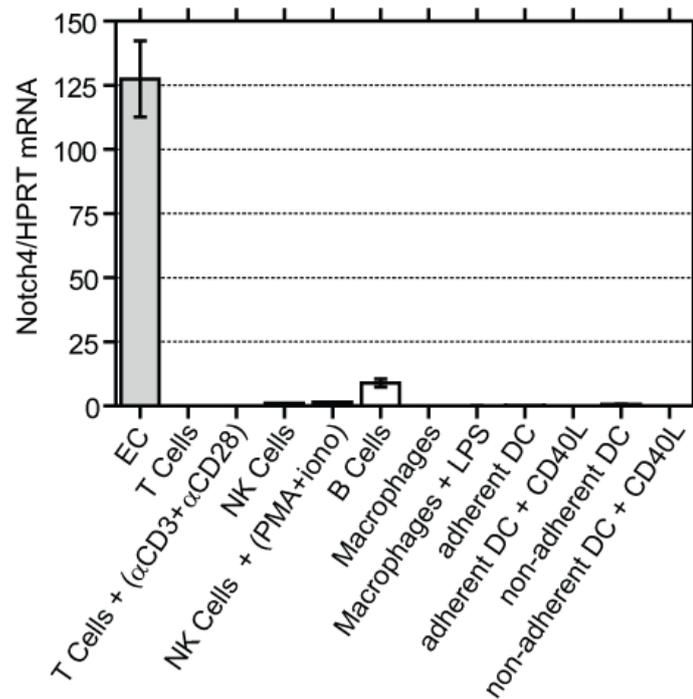
Statistics

Data are represented as means±SE for replicates experiments. Statistical analysis was performed with Graphpad Prism® Software (Graphpad Software, San Diego, CA) by the parametric analysis of variance test. $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Supplemental References

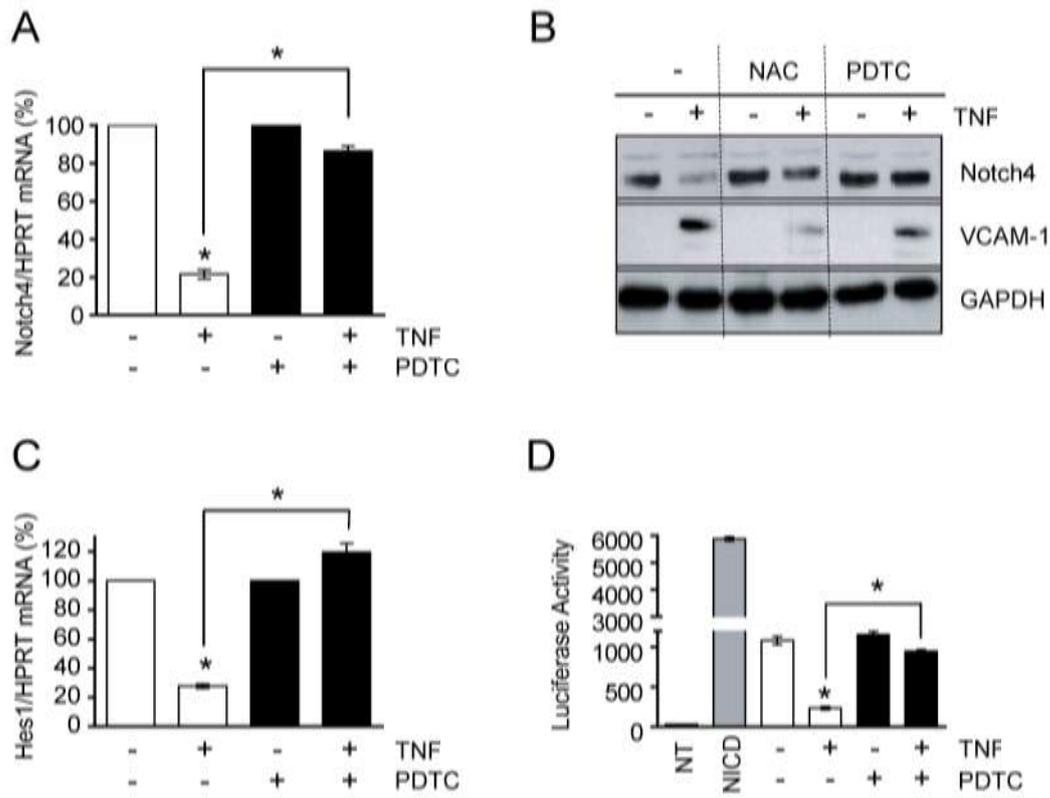
1. Chiffoleau E, Beriou G, Dutartre P, Usal C, Soulillou JP, Cuturi MC. Induction of donor-specific allograft tolerance by short-term treatment with LF15-0195 after transplantation. Evidence for a direct effect on T-cell differentiation. *Am J Transplant.* 2002;2:745-757.
2. Heslan JM, Renaudin K, Thebault P, Josien R, Cuturi MC, Chiffoleau E. New evidence for a role of allograft accommodation in long-term tolerance. *Transplantation.* 2006;82:1185-1193.
3. Charreau B, Cassard A, Tesson L, Le Mauff B, Navenot JM, Blanchard D, Lublin D, Soulillou JP, Aneon I. Protection of rat endothelial cells from primate complement-mediated lysis by expression of human CD59 and/or decay-accelerating factor. *Transplantation.* 1994;58:1222-1229.
4. Hubert FX, Voisine C, Louvet C, Heslan M, Josien R. Rat plasmacytoid dendritic cells are an abundant subset of MHC class II+ CD4+CD11b-OX62- and type I IFN-producing cells that exhibit selective expression of Toll-like receptors 7 and 9 and strong responsiveness to CpG. *J Immunol.* 2004;172:7485-7494.
5. Shawber C, Nofziger D, Hsieh JJ, Lindsell C, Bogler O, Hayward D, Weinmaster G. Notch signaling inhibits muscle cell differentiation through a CBF1-independent pathway. *Development.* 1996;122:3765-3773.
6. Witt CM, Hurez V, Swindle CS, Hamada Y, Klug CA. Activated Notch2 potentiates CD8 lineage maturation and promotes the selective development of B1 B cells. *Mol Cell Biol.* 2003;23:8637-8650.
7. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001;25:402-408.

Supplemental Figure I



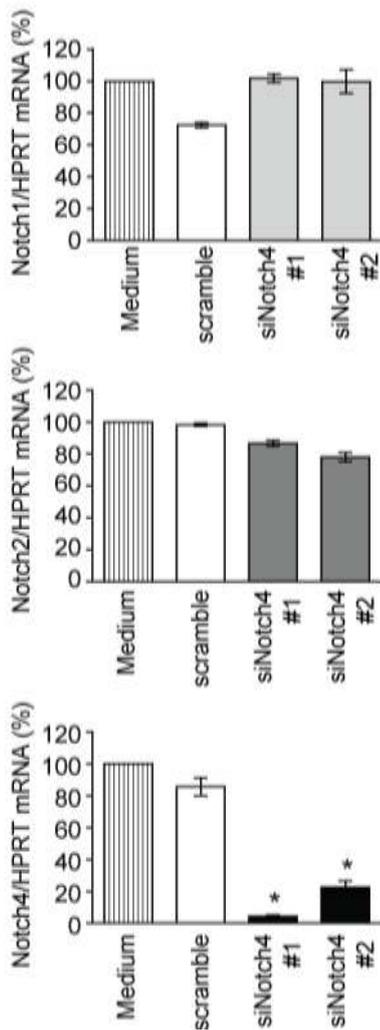
Notch4 expression in immune cellular subsets. Resting and activated immune cellular subsets from LEW rat were subjected to qRT-PCR analysis for Notch4 mRNA and normalized by HPRT quantification. T Cells were stimulated with anti-CD3 and -CD28 mAb for 24h, NK cells were stimulated with PMA and ionomycin for 5h, Macrophages were stimulated with LPS for 24h and dendritic cells (DC) with CD40L for 6h. Data shown are means \pm SE from 3 determinations.

Supplemental Figure II



NF κ B-dependent regulation of Notch4 in EC. HAEC were preincubated with PDTC (100 μ M) or NAC (10mM) for 1 h before a 24 h-treatment with TNF (100 U/ml). Quantitative RT-PCR analysis for Notch4 mRNA expression (A) and a representative analysis of Notch and VCAM-1 protein expression by Western blotting (B) were performed. (C) Notch activity was further analyzed by quantification of Hes1 transcript level using qRT-PCR in HAEC. (D) HUVEC were transfected with a luciferase reporter plasmid CBF1-Luc before treatment. Co-transfection of both CBF1-Luc and the N2NICD plasmids was used as a positive control for Notch activity. Results shown are means of 4 independent experiments and are expressed as relative luciferase activity (in arbitrary units). (*p < 0.05 versus respective control)

Supplemental Figure III



Specificity of Notch4 knockdown by siRNA. HAEC were transiently transfected with no siRNA (medium), a scramble siRNA (scramble) or two different siRNAs targeting Notch4 (siNotch4#1 and #2) (10nM each) using RNAiMax lipofectamine[®]. Notch1, Notch2 and Notch4 mRNA was analyzed by qRT-PCR 48h post transfection and normalized to HPRT level. Results shown are means±SE from 3 independent experiments expressed as percentages of controls (medium), *p < 0.05 versus controls.

Partie 3

(Article 2)

L'activation de Notch2 dans les Cellules Endothéliales induit l'apoptose en bloquant l'expression de la survivine

I. Résumé de l'article

Les molécules de la voie notch régulent des rôles critiques dans la biologie vasculaire. Dans une étude précédente, nous avons montré que l'altération de l'expression de Notch4 médiée par les cytokines pro-inflammatoires dans les vaisseaux d'allogreffe cardiaque, induit la dysfonction endothéliale et pourrait ainsi contribuer à l'artériosclérose du greffon. Malgré l'importance de Notch4 dans le contrôle de la prolifération, de la différenciation et de l'apoptose des cellules endothéliales (CE), peu de données concernent l'implication de Notch1 et plus encore de Notch2 dans la biologie endothéliale.

Cette étude poursuit également l'analyse des interactions entre la voie du TNF et les récepteurs et l'activité de la voie Notch dans les cultures primaires de CE humaines. En particulier, nous montrons que le TNF augmente fortement l'expression et l'activation du récepteur Notch2 dans les CE, corrélée à une forte induction du gène effecteur hey1. Fonctionnellement, l'expression du domaine actif de Notch2 (N2ICD) dans les cultures primaires CE humaines altère la survie cellulaire en induisant l'apoptose. De plus, l'inactivation de Notch2 par siRNA protège les CE de l'apoptose induite par anoïkis, montrant le rôle pro-apoptotique de Notch2 dans les CE. Cet effet est assuré par la répression de l'expression de plusieurs molécules clé impliquée dans le contrôle de la survie/apoptose cellulaire. En particulier, l'activation de Notch2 mène à une forte répression de l'expression transcriptionnelle et protéique de la survivine, alors qu'en contraste, une augmentation de son expression est obtenue à la suite de l'inactivation sélective de Notch2, indiquant le contrôle de l'expression de la survivine par Notch2. Enfin, l'expression ectopique de survivine suffit à prévenir l'apoptose induite par N2ICD.

Ces résultats montrent donc que Notch2 sensibilise les CE à l'apoptose en réprimant l'expression de gènes-clé de la survie cellulaire et indique, parmi ces molécules, un rôle effecteur majeur de la survivine dans la fonction pro-apoptique de Notch2.

II. Article

Notch2 signaling sensitizes endothelial cells to apoptosis by negatively regulating the key protective molecule survivin

Running title: Notch2 sensitizes endothelial cells to apoptosis

Quillard Thibaut¹; Coulon Flora¹; Chatelais Mathias¹, Romagnoli Mathilde², Sophie Barillé-Nion² and Charreau Béatrice¹

¹INSERM, U643, Nantes, F44000 France; CHU Nantes, Institut de Transplantation et de Recherche en Transplantation, ITERT, Nantes, F44000 France; Université de Nantes, Faculté de Médecine, Nantes, F44000 France.

²INSERM, UMR 601, 9 quai Moncoussu, Nantes, F-44093, France and 2INSERM, ERI 7, Nantes, F-44035, France

Correspondance to B. Charreau, INSERM U643, CHU Hotel Dieu, 30, bd Jean Monnet, 44000 Nantes, France, Beatrice.Charreau@univ-nantes.fr.

Tel.: +33 (0)2-40-08-74-16

Fax: +33 (0)2-40-08-74-11

Word count: 6203

Word count of body: 5801

Word count of abstract: 200

Number of Figures and Tables:6

Abstract (w200)

Objective — Notch signaling pathway controls key functions in vascular and endothelial cells (EC) where Notch4 play a major role. However, little is known about the contribution of other Notch receptors. This study investigated regulation of the Notch2 and further examined its implication in EC dysfunction.

Methods and Results — Here, we provide evidence for a novel link between Notch and TNF signaling, where Notch2 is both upregulated and activated in response to TNF. We found that forced expression of Notch2 intracellular domain (ICD) in cultured EC sensitizes cells to apoptosis and allows the significant downregulated expression of several cell-death-related transcripts in a dose-dependant manner. In particular, activation of Notch2 led to a rapid decrease in survivin mRNA and protein expression, while survivin upregulation was obtained by the selective knockdown of Notch2 in EC, indicating that survivin regulation is controlled at the Notch level. Notch2 silencing by siRNA rescued EC from anoikis-induced apoptosis.

Conclusion — In conclusion, we herein show that TNF α signaling activates Notch2 in vascular EC. Notch2 activity sensitizes EC to apoptosis via modulation of multiple components of the apoptotic pathway, including survivin. Overall, our findings also indicate that specific Notch receptors control distinct functions in vascular cells and inflammatory cytokines contribute to this specificity.

Key words: Endothelial cells/ Notch/Survivin/Apoptosis

Short Abstract (w69)

Despite the strong implication of Notch in endothelial and vascular biology, there have been few studies addressing the role of Notch2 in vascular cell phenotype and function. Here, we provide evidence for a novel link between Notch and TNF signaling, where Notch2 is activated in response to TNF and directly controls EC survival and apoptosis via modulation of multiple components of the death receptor–mediated signaling pathway, including survivin.

Key words: Endothelial cells/ Notch/Survivin/Apoptosis

Introduction

Notch signaling pathway regulates a broad array of cell fate decisions and cellular processes in various tissues and in all stages of development (embryonic to adult). The Notch family comprises heterodimer transmembrane receptors consisting of an extracellular domain and a noncovalently linked intracellular domain (ICD). In mammals, 4 Notch receptors (Notch1 through 4) and 5 Notch ligands (Delta-like [Dll]-1, Dll3, Dll4, Jagged1 and Jagged2) have been identified¹. Upon interaction with ligands on neighbouring cells, Notch undergoes proteolytic cleavages managed sequentially by ADAM proteins (a desintegrin and metalloproteinase) and the γ -secretase complex. Release of the cytoplasmic Notch C-terminal intracellular domain (NICD) from the plasma membrane is followed by its translocation into the nucleus where it forms a complex with the CSL family of transcriptional repressors (CBF1/RBP-Jk), removing the repression and allowing for target gene (Hes, Hey) transcription².

Notch proteins display a selective cellular and tissue distribution. The vascular cells express all four Notch receptors but only Notch4 displays an almost exclusively endothelial expression pattern whereas Notch1-3 are expressed more³. It has been known for a while that Notch1 has a critical role in T versus B cell fate development from a common progenitor in the thymus and is involved in leukemogenesis⁴ whereas Notch2 promotes the selective development of B1 B lymphocytes and is predominantly expressed in mature B cells⁵. In the vasculature, Notch1 and -4 are predominantly endothelial, prominent in both arteries and veins while the expression of Notch2 has been reported in pulmonary endothelium⁶. Notch3 is primarily expressed in adult arterial vascular smooth muscle cells (VSMCs). In addition to a specific pattern of tissue expression, several observations suggest that temporal regulation of Notch signaling may be equally important to control the diverse functions of the Notch family. Notch signaling plays a critical role in vascular development and homeostasis⁷ and is involved in vasculogenesis, angiogenesis, differentiation, vascular remodeling, and maturation⁸. Combined deletion of *Notch1* and *Notch4* genes enhance the defects in vasculature remodeling observed in Notch1 single knock-out mice⁹. Endothelial cell (EC)-specific expression of an activated form of Notch4 led to embryonic lethality with abnormal vessel structure and patterning¹⁰. Constitutive activation of Notch4 in EC also causes defects in vascular remodeling¹⁰. *In vitro* experiments also demonstrate that Notch4 activation protects EC from apoptosis, promotes endothelial-to-mesenchymal trans-differentiation and blocks both proliferation and angiogenesis^{11, 12}.

Endothelial cells control vascular tone, leukocyte adhesion, and coagulation and thrombosis by fine-tuned regulation of many cell surface and soluble molecules¹³. EC activation is considered to be an early event which subsequently leads to EC dysfunction and ultimately to vascular injury, key events associated with acute and chronic inflammation, such as occurs during sepsis, atherosclerosis and acute vascular and chronic allograft rejection. Tumor necrosis factor (TNF), an important mediator of innate inflammation, acts on vascular EC to promote the inflammatory response. In cultured human EC, human TNF causes apoptosis, especially in the presence of RNA or protein synthesis inhibitors such as actinomycin D or cycloheximide (CHX), respectively. TNF also activates both NF- κ B and AP-1 in EC, leading to the expression of pro-inflammatory proteins, such as E-selectin (CD62E), ICAM-1 (CD54), VCAM-1 (CD106) and IL-8. The balance of TNF responses generally favours activation rather than apoptosis. TNF also promotes expression of an array of "protective" genes including the zinc finger protein A20, heme-oxygenase-1 (HO-1), Bcl-xL¹⁴. It has been suggested that Notch is necessary for the establishment and/or maintenance of quiescent EC phenotype¹². However, a role for Notch signaling in activated EC phenotype and function upon inflammation has not been documented.

In a previous study, we showed that impaired Notch4 expression caused by pro-inflammatory cytokines in cardiac allograft vessels promotes EC dysfunction and transplant arteriosclerosis¹⁵. Although the importance of Notch4 in controlling EC proliferation, differentiation and survival has been established, little is known about the role of Notch1 and Notch2 expressed on vascular endothelium. This study further investigated the regulatory crosstalk between TNF signaling and Notch receptors and activity in primary cultures of human vascular endothelial cells. In particular, we show that TNF strongly upregulated Notch2 on vascular EC. Moreover, the present work establishes the direct contribution of Notch2 signaling in the transcriptional regulation of several pro- and anti-apoptotic molecules. Both forced Notch2NICD expression and Notch2 silencing demonstrate interplay between Notch2 signaling and survivin expression in the control of EC apoptosis. Taken together, our findings indicate that dysregulated Notch2 signaling sensitizes vascular endothelial cells to apoptosis by the downregulation of a set of mediators of apoptosis and suggest a major role for survivin as effector of Notch signaling.

Material and Methods

DNA constructs, Small interfering RNAs and transfections

The luciferase reporter plasmid that contains 4 copies of a binding site for CBF1 (CBF1-Luc) was a kind gift from Dr. Diane Hayward (Johns Hopkins University, Baltimore, Maryland, USA) ¹⁶. Cells were co-transfected with the N2IC/MSCV plasmid encoding Notch2 NICD kindly provided by Dr Christopher A. Klug CA (University of Alabama at Birmingham, AL, USA) as a positive control for Notch activity ¹⁷. HUVEC were transfected at 70-90% confluence using the Lipofectamine and the PLUS reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, -USA) for 1 h at 37°C in DMEM. Survivin encoding plasmid was kindly provided by Dr Sophie Barille-Nion. For gene silencing, 10⁵ cells were transfected in 6-well plates with RNAiMax lipofectamine® (Invitrogen) and siRNA targeting Notch2 (ID#144339, 72% knockdown, ID#144349, 78% knockdown, ID#144373) or a scrambled negative control (#AM4611) at a final concentration of 10 nM (Ambion, Austin, TX, USA). Validation of siRNA and functional assays were performed 24 to 48 h post-transfection. For each experiment, specific expression knockdown (>70%) was established by qRT-PCR.

Generation of a recombinant adenoviral Vector Encoding Notch2ICD

The N2IC/MSCV plasmid encoding Notch2 NICD was kindly provided by Dr Christopher A. Klug CA (University of Alabama at Birmingham, AL, USA). The 2.3-kbp EcoRI fragment from N2IC/MSCV, containing the coding region of Notch2 intracellular domain was subcloned into pT/BH vector. The EcoRV-NotI fragment was then inserted under the cytomegalovirus promoter into the vector pTrackCMV that contains a second expression cassette for GFP dependant on CMV promoter. The resultant pTrackCMV-N2ICD vector was tested in HUVEC transfections before adenovirus generation. The recombinant adenovirus AdN2ICD was produced in the human embryonic kidney 293 cells by the vector core laboratory of the University Hospital of Nantes (INSERM UMR 649 Gene Therapy Laboratory, Nantes, France) as we previously described¹⁸. The recombinant adenoviruses AdTrack-GFP and –AdMock (Ad DI324) without GFP cDNA were used as a control (AdGFP, AdMock). HUVEC were cultured 70-90% confluence and infected with a multiplicity of infection (moi) of 30/cell for AdN2ICD and AdMock and 5 infectious particles/cell for AdGFP. Adenoviral infection was carried out in ECGM supplemented with 1% FCS for 3 hours at 37 °C, 5% CO₂ under agitation. The cells were washed with medium containing 10% FCS and grown in fresh supplemented endothelial cell growth medium. Transduction efficiency was analyzed 24 h

after infection through GFP detection by direct microscopy imaging and Flow Cytometry using a FACScalibur® (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA).

Cell culture and reagents

Primary EC cultures from human artery (HAEC) and umbilical vein (HUVEC) were isolated and grown as we previously reported¹⁹. EC were cultured in endothelial basal growth medium (ECBM, Promocell, Heidelberg, Germany) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), 0.4% EC growth supplement/heparin, human epidermal growth factor (0.1 ng/mL), human basic fibroblast growth factor (1 ng/mL), hydrocortisone (1 µg/mL), gentamicin (50 µg/mL), and amphotericin (50 ng/mL). Before activation, confluent EC monolayers were maintained for 24 h in basal ECBM supplemented with 2% FCS and then incubated with Human Recombinant TNF (100 U/mL, provided by Professor P. Neuman, BASF, Ludwigshafen, Germany).

Anoikis – To induce anoikis, HUVEC were seeded on plates pre-coated with or without poly(2-hydroxyethyl methacrylate) ([poly-HEMA]; Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA) and cultured for 12h. Then, attached and floating cells were harvested by using trypsin digestion for analysis.

Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction RT-PCR & PCR arrays

RNA was isolated using Trizol reagent (Invitrogen) and treated with Turbo DNase® (Ambion) before reverse transcription (RT). Subsequent to RT, cDNAs were amplified by PCR and analyzed in agarose gels stained with ethidium bromide. Quantitative PCRs were performed using the ABI PRISM 7700 and 7900 sequence detection application program (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). For quantification, duplicates were normalized by the concomitant quantification of hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase (HPRT). Relative expression was calculated according to the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method, as previously described²⁰. Custom primers for Notch1 (5' GACGGACCCAACACTTACAC 3', 5' TCAGGCAGAAGCAGAGGTAG 3'), Notch2 (5' GCAGGAGGTGGATGTGTTAG 3', 5' CCAGGATCAGGGGTGTAGAG 3'), Notch3 (5' CTCATCCGAAACCGCTCTAC 3', 5' AGTCTCTCCTGGGCTACGTC 3'), Notch4 (5' TGTTTGATGGCTACGACTGT 3', 5' TCCTTACCCAGAGTCCTACC 3'), hey1 (5' CAGGCAACAGGGGGTAAAGG 3', 5' GTGGAGCGGATGATGGTGGT 3') and β -actin (5' TCTGGCACACACCTTCTAC 3', 5' CAGCTTCTCCTTAATGTCAC 3') were obtained from MWG (High Point, NC, USA) and used for RT-PCR analysis. Human Apoptosis PCR array primer sets (Real Time Primers, Elkins Park, PA, USA) were used at a 0.3 µM final concentration. Transcript levels were quantified by qRT-PCR with the following primers and probe from Applied Biosystems: Notch2

(Hs00225747_m1), hey1 (Hs00232618_m1), survivin (Hs00977611_g1), bim (Hs00197982_m1), DAPK2 (Hs00204888_m1), HRK (Hs00705213_s1), DR5 (Hs00366272_m1), CD40 (Hs00374176_m1), APRIL (Hs00182565_m1) and HPRT (H99999909_m1).

Western blot analysis

Cells were lysed on ice in RIPA lysis buffer supplemented with Protease Inhibitors Cocktail (PIC, Sigma–Aldrich). Cell lysates were resolved by SDS-PAGE (7.5%–10%) and subjected to Western immunoblot using specific antibodies for Notch2 (DSHB, Iowa City, IA, USA), cleaved-Notch2 (Millipore, Temecula, CA, USA) survivin (R&D Systems, Abingdon, UK), VCAM-1 (Santa Cruz Biotechnology), and GAPDH (Oncogene, MERCK EuroLab, Val de Fontenay, France) and secondary horseradish peroxidase-labeled antibodies (CST, St Quentin-en-Yveline, France ; Serotec, Martinsried, Germany). Antibody-bound proteins were detected using an enhanced chemiluminescence kit (ECL, Amersham, Buckinghamshire, UK). Results shown are representative of at least 3 independent experiments.

For Immunofluorescence, cytopins of EC transfected with pTrackCMV-N2ICD were subjected to Notch2 labelling with Notch2 ab (DSHB).

Cell Viability and Apoptosis Analysis

Viability assay - At 48h post-transfection, cells were washed twice with PBS and incubated with 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, 5 mg/mL in complete medium; Sigma Aldrich) for 4 h at 37°C. MTT was removed and the formazan crystals were solubilized in DMSO. OD for each condition was measured in triplicates at 570 nm (MRX, Dynatech laboratories, Chantilly VA, USA).

Cellular DNA Content Analysis & Annexin V staining- Cellular DNA content analyses were performed by flow cytometry as follows: 48 h after transfection, EC were harvested using trypsin/EDTA, washed twice in PBS, fixed in ice-cold 70% ethanol under vortexing, and incubated for 24 h at 4°C. Fixed cells were then stained with 50 µg/mL propidium iodide (PI, Sigma-Aldrich), 100 units/mL RNase A, 1 mg/mL glucose in PBS (1 ml/1 x 10⁶ cells). For apoptosis detection, EC were harvested, washed and resuspended in 100µl of Binding Buffer (10 mM HEPES, pH 7.4, 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl₂) with 5 µl of annexin V-APC for 15 minutes. Fluorescence was measured on 10,000 cells/sample using a FACScalibur® (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) and analyzed using FlowJo® software (Tree Star, Inc.). Results shown are representative of at least 3 independent experiments.

Statistics

Data are represented as means \pm SEM for replicates experiments. Statistical analysis was performed with Graphpad Prism[®] Software (Graphpad Software, San Diego, CA) by the t-test or parametric analysis of variance test as appropriate. $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

TNF α induces Notch2 expression and signaling in vascular endothelial cells

TNF signaling in vascular human EC activates signaling pathways that regulate coordinately the transcription of a large set of molecules involved in inflammation, coagulation, thrombosis, vascular tone, immune response¹³. Moreover, TNF signaling also regulate a fine tune balance of pro- and anti-apoptotic factors that control EC survival and, ultimately, vascular injury and remodeling²¹. Consequently, the first aim of this study was to investigate how TNF signaling may control the expression of Notch receptors (Notch 1, 2, 3 and 4) in cytokine-activated endothelial cells. Firstly, primary cultures of ECs were treated for 0 to 24 h with recombinant TNF and transcript levels were analyzed by RT-PCR. As shown in **Figure 1A**, TNF selectively modulates the mRNA steady-state levels of the Notch receptors. TNF decreased transcript levels for Notch 1, 3 and 4 with a significant effect starting 2 h after treatment and maximal inhibition of $49 \pm 7\%$, $88 \pm 2\%$ and $78 \pm 2\%$ for Notch-1, -3 and -4 as compared with basal levels ($p < 0.05$ for all) (Figure 1B). In contrast, an enhanced mRNA level for Notch 2 was found in response to TNF, corresponding to a 3.3 ± 0.3 -fold increase at 24 h ($p < 0.05$) as compared with the basal mRNA level. TNF-regulated expression for Notch2 was further confirmed by western blotting (**Figure 1B**). TNF also triggers the activation of Notch2 signaling as reflected by the transient induction of the cleaved form of Notch2 (c-Notch2) receptor starting at 2h and maximal at 6h post-treatment (**Figure 1B**). Expression of, Hairy/Enhancer of split (Hes) and Hairy-related (hey/herp) transcription factors has been shown to be regulated by activation of Notch receptors². Among these molecular targets of Notch activity, TNF α was found to drive a selective increase in hey1 mRNA (**Figure 1C**) while; in contrary, herp1 and hey2 mRNA exhibit a significant decrease (data not shown). Activation of Notch signaling in response to TNF α , reflected by hey1 transcription, measure by QPCR, was strongly abrogated in the presence of a γ -secretase inhibitor (DAPT) (**Figure 1D**). Together, these findings indicate that TNF strongly modulates the pattern of Notch expressed on ECs by increasing Notch 2 expression and activity in parallel to the induction of hey1 effector gene.

Activation of Notch2 signaling in vascular EC

Despite the strong implication of Notch in endothelial and vascular biology, there have been few studies addressing the role of Notch2 in vascular cell phenotype and function. Our analysis thus focused on regulating the Notch2 pathway in vascular human ECs. To this end, we first generated a recombinant adenoviral vector encoding the intra-cellular domain of Notch2 (Notch2NICD) and GFP as a reporter gene (AdN2NICD). As GFP expression is

tightly correlated with the expression of the gene cloned upstream, we were able to identify ECs expressing Notch2NICD by analyzing GFP fluorescence. Controls were mock infected cells (empty AdDL324) and cells transduced with a recombinant adenovirus encoding GFP alone (AdGFP) to account for any effects that may be due to adenoviral infection. Expression of GFP and Notch2 in cultured ECs was examined 24 h post-infection. Adenoviral vectors allowed the transduction of 90%–95% of EC for both vectors, as reflected by GFP expression analyzed by flow cytometry (**Figure 2A**). Optimal infection was achieved at multiplicity of infection (moi) of 5 (viral particles/cell) and 30 for AdGFP and AdN2ICD, respectively that allow similar GFP expression as controlled by flow cytometry and fluorescence microscopy (**Figures 2A and 2B**). Expression of Notch2ICD in transduced EC was attested by immunofluorescence showing that Notch2ICD in GFP positive cells is restricted to the nucleus, as expected (**Figure 2C**). Western blot analysis further indicates that, similar to GFP, Notch2NICD expression is dose-dependent in transduced EC (**Figure 2D**). Next, to validate the ability of Notch2NICD to promote global Notch pathway activity, EC have been co-transfected with a luciferase reporter plasmid that contains 4 copies of a binding site for CBF1 (4xwtCBF1-Luc) and the plasmid encoding AdN2NICD. **Figure 2E** shows the significant, and dose-dependent, increase in CBF1 promoter activity in EC demonstrating that Notch2NICD promotes CBF1/luciferase activity in our conditions.

Notch2 signaling elicits EC death and apoptosis

Notch2 signaling was then tested for regulation of apoptosis. First, the effect of N2NICD on EC viability was examined by a DNA content analysis from 24 to 72h after infection (**Figure 3A**). At 24h, no significant effect was observed. At 48h, a significant decrease in cell viability ($39\pm 14\%$) was found when EC were infected with AdN2ICD at moi 40 while a lower dose of virus (moi 20) decreases cell survival by $22\pm 9\%$ indicating that Notch2NICD-induced cell death is a dose-dependent process. Finally, at 72h post-infection, in contrast to AdGFP control that did not alter cell survival, AdN2ICD was sufficient to drastically induce cell death ($40\pm 14\%$ and $67\pm 6\%$ of cell death for moi 20 and 40, respectively). To test whether EC death reflected apoptosis, EC were labeled with AnnexinV 48h after infection and apoptotic cells were detected by flow cytometry. As shown in **Figure 3B**, Notch2NICD strongly induces apoptosis in a dose dependant manner. AdN2ICD transduced EC displayed 9%, 15% and 40% of apoptotic cells for moi 20, 30 and 40, respectively. In contrary, no effect was observed after AdGFP infection (moi of 5) or with the corresponding empty Adenovirus (AdDL324) at a moi of 40 thus attesting that the deleterious effect of AdN2ICD was not due to the viral charge. Altogether, these results suggest that a major consequence of Notch2

activation in vascular EC is the induction of apoptosis in a time- and dose-dependent manner.

Activated Notch2 broadly repress the transcription of apoptosis mediators

To examine the underlying mechanisms by which Notch2 NICD sensitizes EC to apoptosis, an apoptosis-dedicated QRT-PCR array displaying 88 pro- and anti-apoptotic molecules was used. Fold changes in gene expression between AdN2NICD-infected EC and controls are depicted in the **Figure 4**. For the selection of candidate genes, only transcript exhibiting an over 10-fold ratio regulation compared to the AdGFP control were considered. Consequently, 7 candidates were selected; all were down regulated in response to N2NICD. We found that 5 out the 7 regulated genes were the pro-apoptotic molecules Bim, death-associated protein kinase 2 DAPK2, HRK (Harakiri), DR5 (a TRAIL receptor), and CD40 (a member of TNF receptor superfamily) which expression was highly repressed in response to N2NICD (13.5-, 24.8-, 10.9-, 14.1-, 28.2-fold decrease *versus* AdGFP control, respectively; * $p < 0.05$) (**Figure 4A**). Our findings also indicate that N2NICD significantly decreases gene transcript for 2 protective anti-apoptotic molecules: survivin and April (11.9- and 10.7-fold decreased as compared to control, respectively; * $p < 0.05$). Decreased transcript levels were further confirmed by quantitative RT-PCR and found correlated to Notch2 expression (**Figure 4B**).

Since we found that forced expression of Notch2NICD in cultured EC elicits apoptosis that correlates with the significant down regulated expression of the potent inhibitor of apoptosis survivin we speculate that survivin could be a key regulator of Notch2 signaling. Therefore, we further examined the possible involvement of survivin in Notch2-induced apoptosis. **Figure 4C** shows that N2NICD drastically repressed survivin transcript level with a dose-dependent effect (9.6 ± 1.0 - and 30.8 ± 1.3 -fold decrease at moi 20 and moi 40, respectively; * $p < 0.05$). Moreover, regulation of survivin protein expression by Notch2 was confirmed by western blotting and was found dependant on N2NICD in EC. Our results suggest therefore that Notch2 activation could mediate EC apoptosis by negatively regulating the key protective *survivin* gene.

Notch2 silencing by RNA interference promotes survivin expression and rescues EC from apoptosis

Based on the above results, we further investigated the possible crosstalk between apoptotic pathway and Notch2 signaling in EC. Because many genetic studies show that the Notch pathway is very dose-sensitive, we used a loss-of-function model for Notch2 using Notch2 siRNA. This approach was designed to determine the function of endogenous Notch2

signaling on EC survival. To test whether inhibition of basal Notch2 could modulate apoptosis, EC were transfected with specific Notch2 targeted siRNAs. Non targeting scramble SiRNAs were used as controls. Among the 3 tested siRNA, 2 displayed a significant down-regulation of Notch2, at mRNA level by qRT-PCR ($71\pm3\%$ $78\pm6\%$ of inhibition for siN2#1 and #2, respectively, as compared to control siRNA) (**Figure 5A**). **Figure 5B** demonstrates that, in contrast to N2ICD that inhibited survivin expression, Notch2 silencing significantly increases survivin mRNA in vascular EC (9.8- and 7,7 fold increase *versus* scramble control). This regulatory effect was further confirmed at protein level by western blotting (**Figure 5C**). To test whether Notch2 inhibition could protect EC from apoptosis, EC were cultured for 48h after siRNA transfection before induction of anoikis (**Figure 5D**). Apoptosis was then quantified by DNA content analysis. First, we observed that knockdown of Notch2 did not significantly allow death of adherent EC monolayers thus demonstrating that Notch2 repression was not able to induce per se EC apoptosis. Moreover, when EC were maintained in suspension during 16h, Notch2 knockdown significantly rescued EC from anoikis (30.9% of survival compared to SiRNA control), suggesting that Notch2 exhibits opposing apoptotic functions depending of its expression and activation level. Finally, as shown in the **Figure 6**, transfection of survivin cDNA efficiently reverses cell apoptosis mediated by N2NICD (47.9% versus 82.1% of cell death). Together, our data suggest that, Notch2 inhibition protects EC from apoptosis by increasing survivin expression level, indicating that survivin regulation is controlled at the Notch level.

Discussion

Here, we provide evidence for a novel link between Notch and TNF signaling, where Notch2 is activated in response to TNF and directly controls expression of several genes involved in EC survival and apoptosis. Activation of Notch2 led to a rapid decrease in survivin mRNA and protein expression, and survivin upregulation was obtained by the selective knockdown of Notch2 in EC, indicating that survivin regulation is controlled at the Notch level. Although both pro- and anti-apoptotic genes are upregulated in response to TNF α , it is well known that TNF does not induce EC apoptosis *per se*¹³, but Notch2 appears to promote it. Consequently, we speculate that that activation of Notch2 signaling in response to TNF may be a transient and negative regulatory feedback within the TNF signaling pathway.

Overall, our study reports a pro-apoptotic role for Notch2 signaling and indicates that specific Notch receptors control distinct cell fate decisions in the vascular system. Previous studies demonstrate that Notch4 activation protects EC from apoptosis, promotes endothelial-to-mesenchymal trans-differentiation and blocks both proliferation and angiogenesis^{11, 22}. Thus, our findings further substantiated the emerging concept that the Notch molecules display unique functions. This functional specificity was already exemplified in the lymphopoietic system by the genetic mouse models in which Notch1 deficiency results in impaired T-cell development⁴, while Notch2 deficiency causes a dramatic absence of MZB cells⁵. Accordingly, a recent study demonstrates that activation of different Notch receptors in the human mammary adenocarcinoma cell line MDA-MB-231 leads to dramatically opposing effects, leading to either increased apoptosis in the case of Notch2 or increased proliferation in the case of Notch4²³. This is also in line with the finding that different Notch ICDs have different target sequence selectivity²⁴

Strikingly, it remains a critical question how various mammalian Notch receptors and ligands exert their unique functional activities. Indeed, such specificity is not completely explained by differential expression patterns or preferential molecular interactions of Notch receptors or ligands, suggesting that other genes can contribute to specifying Notch receptor functions. Our previous study¹⁵ and results presented here indicate that TNF elicits a drastic change in the pattern of Notch receptors expressed on vascular EC. This change corresponds to phenotypic switch where Notch4 is replaced by Notch2. No significant change in Notch1 protein was observed. Mechanistically, activation of Notch2 signaling favors cell death while Notch4 activation was shown to be protective¹¹. Thus it is tempting to speculate that cytokines (i.e. TNF α) by modulating Notch signaling and function provide

another step to Notch regulation. Another (non exclusive) possibility to consider comes from the recent study by Wu et al. that discovered an unexpected role for the Notch coactivator *Maml1* in mediating the specific signaling of Notch2²⁵. These findings suggesting that individual *Maml* coactivators may regulate molecular specificity of Notch receptor functions remains to be confirmed.

Apoptosis is believed to be an important factor in vascular remodeling in normal and pathologic conditions²¹. Survivin is an inhibitor of apoptosis protein (IAP) that is upregulated in cancer and has recently been implicated in vascular injury²⁶. Survivin was originally detected in tumors; however, subsequent studies have revealed that many normal adult tissues express survivin albeit at levels lower than cancer cells. Survivin is an essential protein in that disruption of the survivin locus in mice results in early embryonic lethality²⁷. This reflects a critical dual function of survivin in the regulation of cell division and the preservation of cell viability. The demonstration that survivin levels in normal tissues can be up-regulated by cytokines suggests that survivin may have physiologic roles in regulating proliferation and survival²⁸. Although the existence of functional survivin–caspase complexes is controversial, the ability of survivin to inhibit apoptosis has been clearly demonstrated²⁹. Expression of survivin protects normal or transformed cells from apoptosis³⁰ while forced expression of survivin inhibits various forms of cell death both *in vitro* and *in vivo*²⁷. Lack of endothelial cell survivin resulted in embryonic lethality. Mutant embryos had prominent and diffuse hemorrhages from embryonic day 9.5 (E9.5) and died before E13.5³¹. Our findings are complementary to studies in primary cultured human VSMC where induction of apoptosis by inflammatory cytokines, (IFN γ , TNF α , IL1 β) was completely prevented by survivin overexpression³². Conversely, transduction with a mutated inactive form of survivin directly induced apoptosis in the absence of cytokine and greatly sensitized cells to the apoptotic stimulus. Interestingly, survivin markedly up-regulated PDGF promoter activity and gene expression in VSMC whereas that PDGF receptor (PDGFR)-beta is an immediate Notch target gene which is upregulated in response to activated Notch pathway³³. Therefore, survivin may act upstream of gene expression and directly influence the transcription of pivotal growth-related gene(s) in vascular cells. In the future, this information might lead to novel strategies to prevent cancer and vascular diseases where Notch/ survivin signaling plays a pathogenic role.

In conclusion, we herein show for the first time that TNF α signaling strongly upregulates and activates Notch2 in vascular EC. Our findings demonstrate that Notch2 activity sensitizes EC to apoptosis via modulation of multiple components of the death receptor–mediated signaling pathway, including survivin.

References

1. Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science*. 1999;284(5415):770-776.
2. Iso T, Kedes L, Hamamori Y. HES and HERP families: multiple effectors of the Notch signaling pathway. *J Cell Physiol*. 2003;194(3):237-255.
3. Uyttendaele H, Marazzi G, Wu G, Yan Q, Sassoon D, Kitajewski J. Notch4/int-3, a mammary proto-oncogene, is an endothelial cell-specific mammalian Notch gene. *Development (Cambridge, England)*. 1996;122(7):2251-2259.
4. Radtke F, Raj K. The role of Notch in tumorigenesis: oncogene or tumour suppressor? *Nat Rev Cancer*. 2003;3(10):756-767.
5. Saito T, Chiba S, Ichikawa M, Kunisato A, Asai T, Shimizu K, Yamaguchi T, Yamamoto G, Seo S, Kumano K, Nakagami-Yamaguchi E, Hamada Y, Aizawa S, Hirai H. Notch2 is preferentially expressed in mature B cells and indispensable for marginal zone B lineage development. *Immunity*. 2003;18(5):675-685.
6. Villa N, Walker L, Lindsell CE, Gasson J, Iruela-Arispe ML, Weinmaster G. Vascular expression of Notch pathway receptors and ligands is restricted to arterial vessels. *Mech Dev*. 2001;108(1-2):161-164.
7. Iso T, Hamamori Y, Kedes L. Notch signaling in vascular development. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23(4):543-553.
8. Gridley T. Vascular biology: vessel guidance. *Nature*. 2007;445(7129):722-723.
9. Krebs LT, Xue Y, Norton CR, Shutter JR, Maguire M, Sundberg JP, Gallahan D, Closson V, Kitajewski J, Callahan R, Smith GH, Stark KL, Gridley T. Notch signaling is essential for vascular morphogenesis in mice. *Genes Dev*. 2000;14(11):1343-1352.
10. Uyttendaele H, Ho J, Rossant J, Kitajewski J. Vascular patterning defects associated with expression of activated Notch4 in embryonic endothelium. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(10):5643-5648.
11. MacKenzie F, Duriez P, Wong F, Nosedà M, Karsan A. Notch4 Inhibits Endothelial Apoptosis via RBP-J κ -dependent and -independent Pathways. *J Biol Chem*. 2004;279(12):11657-11663.
12. Nosedà M, Chang L, McLean G, Grim JE, Clurman BE, Smith LL, Karsan A. Notch activation induces endothelial cell cycle arrest and participates in contact inhibition: role of p21Cip1 repression. *Mol Cell Biol*. 2004;24(20):8813-8822.
13. Pober JS. Endothelial activation: intracellular signaling pathways. *Arthritis Res*. 2002;4 Suppl 3:S109-116.
14. Bach F, H., Hancock W, W., Ferran C. Protective genes expressed in endothelial cells: a regulatory response to injury. *Immunol. Today*. 1997;18:483-486.
15. Quillard T, Coupel S, Coulon F, Fitau J, Chatellais M, Cuturi MC, Chiffolleau E, Charreau B. Impaired Notch4 activity elicits EC activation and apoptosis: implication for Transplant Arteriosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008;in revision.
16. Shawber C, Nofziger D, Hsieh JJ, Lindsell C, Bogler O, Hayward D, Weinmaster G. Notch signaling inhibits muscle cell differentiation through a CBF1-independent pathway. *Development*. 1996;122(12):3765-3773.
17. Witt CM, Hurez V, Swindle CS, Hamada Y, Klug CA. Activated Notch2 potentiates CD8 lineage maturation and promotes the selective development of B1 B cells. *Mol Cell Biol*. 2003;23(23):8637-8650.

18. Fitau J, Bouday G, Coulon F, Quillard T, Charreau B. The adaptor molecule LNK negatively regulates TNFalpha -dependent VCAM-1 expression in endothelial cells through inhibition of the ERK1 and 2 pathways. *J Biol Chem*. 2006.
19. Coupel S, Leboeuf F, Bouday G, Souillou JP, Charreau B. RhoA activation mediates phosphatidylinositol 3-kinase-dependent proliferation of human vascular endothelial cells: an alloimmune mechanism of chronic allograft nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2004;15(9):2429-2439.
20. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25(4):402-408.
21. Cailhier JF, Laplante P, Hebert MJ. Endothelial apoptosis and chronic transplant vasculopathy: recent results, novel mechanisms. *Am J Transplant*. 2006;6(2):247-253.
22. Nosedá M, McLean G, Niessen K, Chang L, Pollet I, Montpetit R, Shahidi R, Dorovini-Zis K, Li L, Beckstead B, Durand RE, Hoodless PA, Karsan A. Notch Activation Results in Phenotypic and Functional Changes Consistent With Endothelial-to-Mesenchymal Transformation. *Circ Res*. 2004.
23. O'Neill CF, Urs S, Cinelli C, Lincoln A, Nadeau RJ, Leon R, Toher J, Mouta-Bellum C, Friesel RE, Liaw L. Notch2 signaling induces apoptosis and inhibits human MDA-MB-231 xenograft growth. *Am J Pathol*. 2007;171(3):1023-1036.
24. Ong CT, Cheng HT, Chang LW, Ohtsuka T, Kageyama R, Stormo GD, Kopan R. Target selectivity of vertebrate notch proteins. Collaboration between discrete domains and CSL-binding site architecture determines activation probability. *J Biol Chem*. 2006;281(8):5106-5119.
25. Wu L, Maillard I, Nakamura M, Pear WS, Griffin JD. The transcriptional coactivator Maml1 is required for Notch2-mediated marginal zone B-cell development. *Blood*. 2007;110(10):3618-3623.
26. Blanc-Brude OP, Yu J, Simosa H, Conte MS, Sessa WC, Altieri DC. Inhibitor of apoptosis protein survivin regulates vascular injury. *Nat Med*. 2002;8(9):987-994.
27. Altieri DC. Survivin, versatile modulation of cell division and apoptosis in cancer. *Oncogene*. 2003;22(53):8581-8589.
28. Kirkiles-Smith NC, Mahboubi K, Plescia J, McNiff JM, Karras J, Schechner JS, Altieri DC, Pober JS. IL-11 protects human microvascular endothelium from alloinjury in vivo by induction of survivin expression. *J Immunol*. 2004;172(3):1391-1396.
29. Romagnoli M, Trichet V, David C, Clement M, Moreau P, Bataille R, Barille-Nion S. Significant impact of survivin on myeloma cell growth. *Leukemia*. 2007;21(5):1070-1078.
30. Altieri DC. Targeted therapy by disabling crossroad signaling networks: the survivin paradigm. *Mol Cancer Ther*. 2006;5(3):478-482.
31. Zwerts F, Lupu F, De Vriese A, Pollefeyt S, Moons L, Altura RA, Jiang Y, Maxwell PH, Hill P, Oh H, Rieker C, Collen D, Conway SJ, Conway EM. Lack of endothelial cell survivin causes embryonic defects in angiogenesis, cardiogenesis, and neural tube closure. *Blood*. 2007;109(11):4742-4752.
32. Wang GJ, Sui XX, Simosa HF, Jain MK, Altieri DC, Conte MS. Regulation of vein graft hyperplasia by survivin, an inhibitor of apoptosis protein. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25(10):2081-2087.
33. Jin S, Hansson EM, Tikka S, Lanner F, Sahlgren C, Farnebo F, Baumann M, Kalimo H, Lendahl U. Notch signaling regulates platelet-derived growth factor receptor-beta expression in vascular smooth muscle cells. *Circ Res*. 2008;102(12):1483-1491.

Figure legends

Figure 1. Expression of Notch receptors and Notch2 activity in response to TNF α . (A) RT-PCR for Notch1 to 4 and β -actin transcripts in cultured human vascular EC treated with TNF α (100 U/mL). (B) A representative western blotting showing the time-course expression of the native Notch2 and the cleaved form (c-Notch2) in response to TNF α . VCAM-1 and GAPDH were determined after reprobing. Blots are representative of 3 independent experiments. (C) RT-PCR for Notch2 and hey1 transcripts in cultured human vascular EC treated with TNF α (100 U/mL) for the indicated periods. (D) Quantification of hey1 transcripts by QRT-PCR in EC stimulated with TNF α with and without an inhibitor of γ -secretase (DAPT); *p<0.05 versus controls).

Figure 2. Activation of Notch2 signaling in EC. (A) Dose-dependent transduction of EC according to moi for the recombinant AdGFP and AdN2NICD. Results are expressed as percentage of GFP-expressing cells determined by flow cytometry. (B) Western blot of primary EC transduced with AdN2NICD at various moi and analyzed for Notch2 and (after reprobing) GAPDH protein levels. Non infected (NI) and EC infected with AdGFP are used as controls. (C) A representative analysis of GFP expression by fluorescence microscopy in EC transduced with AdGFP or AdN2NICD. (D) HUVEC were cotransfected with a luciferase reporter plasmid that contains 4 copies of a binding site for CBF1 (CBF1-Luc) and a plasmid encoding the intracellular domain of Notch2 (pAdN2NICD). Controls included non transfected EC (NT), CBF1/luc-transfected cells treated with medium or an inhibitor of γ -secretase (DAPT). Results shown are means \pm SEM of 4 independent experiments and are expressed as relative luciferase activity (in arbitrary units). (E) Immunoreactivity for N2NICD correlated to GFP expression in EC transduced with AdN2NICD.

Figure 3. Notch2 activation elicits cell death and apoptosis. (A) EC viability was quantified 48h post-infection with AdGFP or AdN2NICD using a DNA content assay. Results shown are means \pm SEM of 3 independent experiments (*p<0.05 versus controls). (B) Cell Apoptosis was examined 48h post-transduction after staining with AnnexinV and quantified by flow cytometry. Percentages of annexin V positive cells are indicated.

Figure 4. Notch2 signaling downregulates a set of apoptosis mediators. (A) A schematic representation of apoptosis-related transcripts regulated by Notch2NICD determined by a dedicated PCR array. Results are shown as fold changes compared to AdGFP. Selected pro- and anti-apoptotic molecules are indicated. (B) Validation of transcript regulation by QRT-PCR in EC transduced with AdN2NICD (at moi 20 and 40) in comparison to controls (Non infected (NI) and AdGFP), *p<0.05 versus controls. (C) Validation of survivin mRNA regulation by QRT-PCR in EC transduced with AdN2NICD (at moi 20 and 40) in comparison to controls (Non infected (NI) and AdGFP), *p<0.05 versus controls. (D) Dose-response effect of AdN2NICD on Survivin protein and GAPDH expression determined by western blot. Results are representative of 3 independent experiments

Figure 5. Notch2 knockdown increases survivin and rescues EC from apoptosis. (A) Validation by QRT-PCR of Notch2 silencing using siRNA targeting Notch2 (siN2=1, siN2=2) or scramble siRNA. (B) Quantification by QRT-PCR of survivin mRNA in EC transfected with a scramble siRNA or siRNA targeting Notch2 (siN2=1, siN2=2). NT: non transfected cells. Results shown are means \pm SEM of 3 independent experiments normalized to HPRTmRNA and are expressed as arbitrary units, *p<0.05 versus controls. (C) Survivin, Notch2 and GAPDH expression determined by western blot. (D) DNA content analysis on adherent and floating EC after induction of anoikis on siRNA transfected cells. Percentages of apoptotic are indicated.

Figure 6. Survivin prevents apoptosis mediated by Notch2. EC were transduced with AdGFP or AdN2NICD after transfection with a plasmid encoding survivin full cDNA (pcDNA-survivin) or the empty plasmid (pcDNA-mock) as a control. Apoptosis was measured by DNA content after staining with propidium iodide. Percentages of apoptotic are indicated and representatives of 3 independent experiments.

FIGURE 1

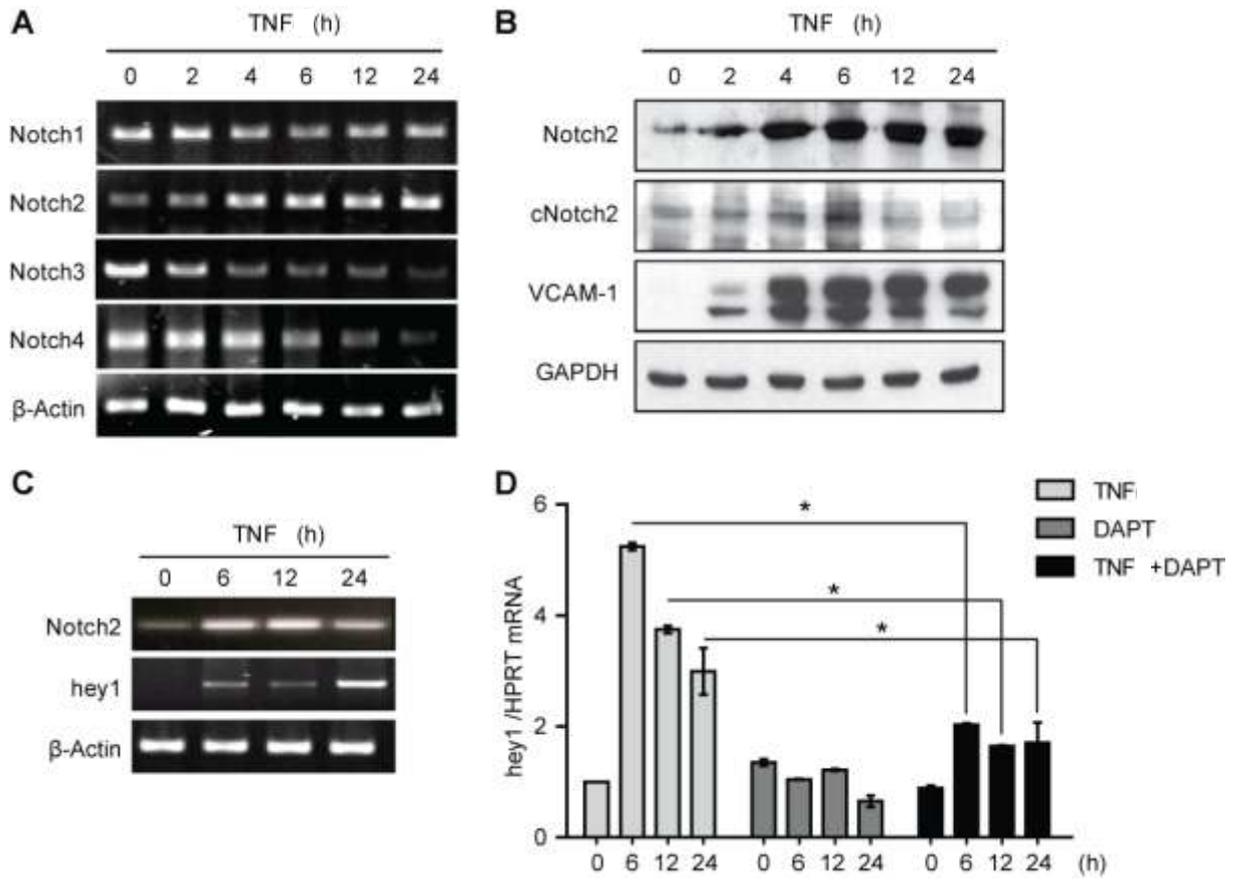


FIGURE 2

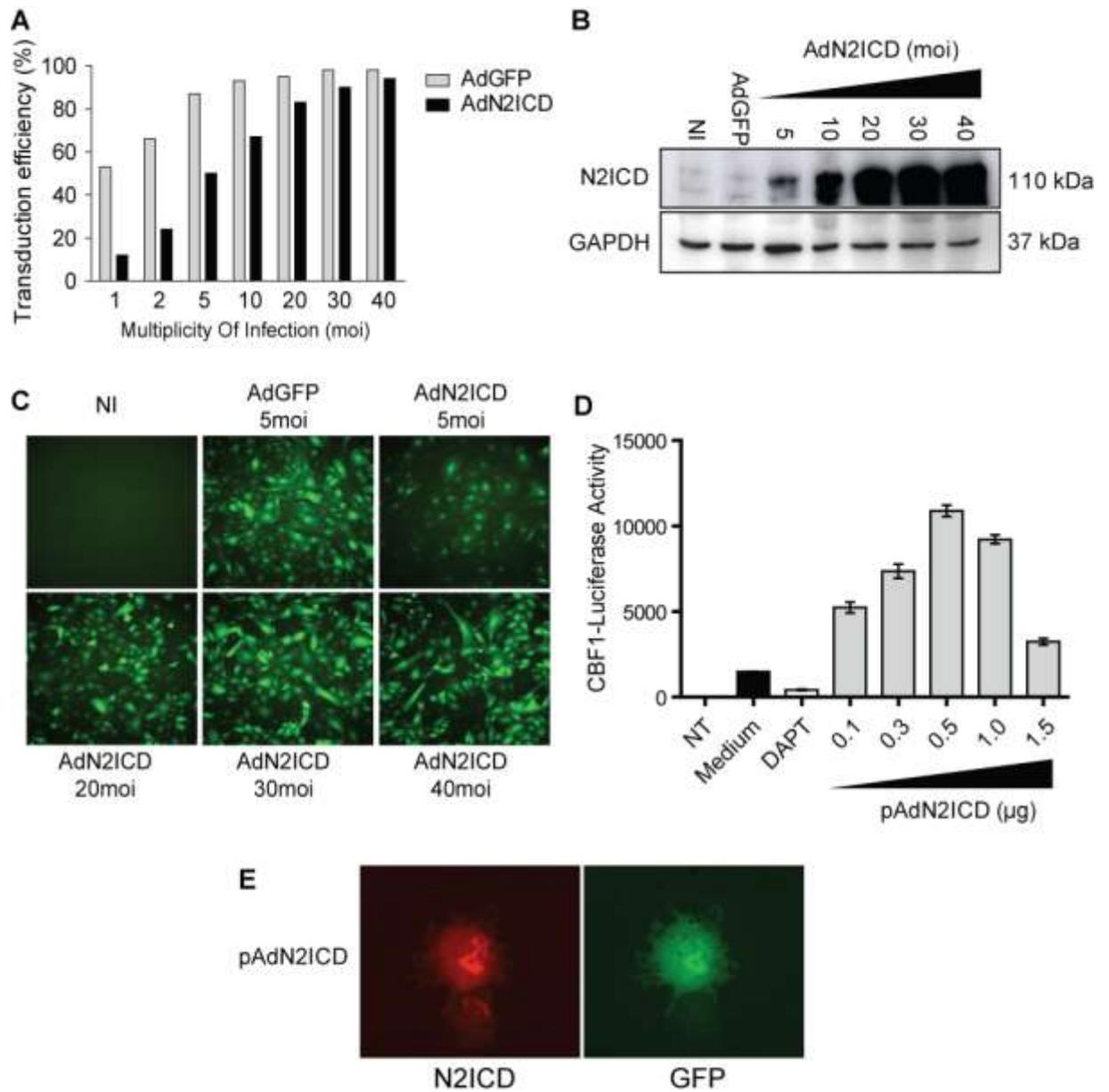


FIGURE 3

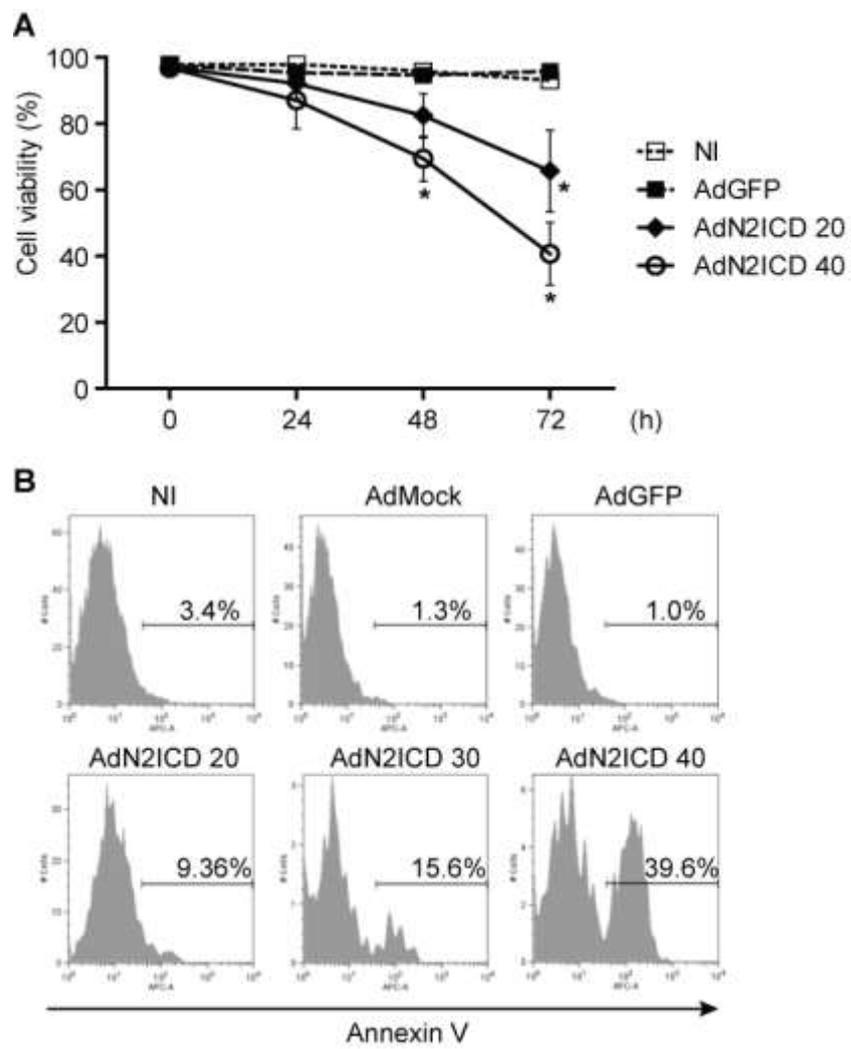


FIGURE 4

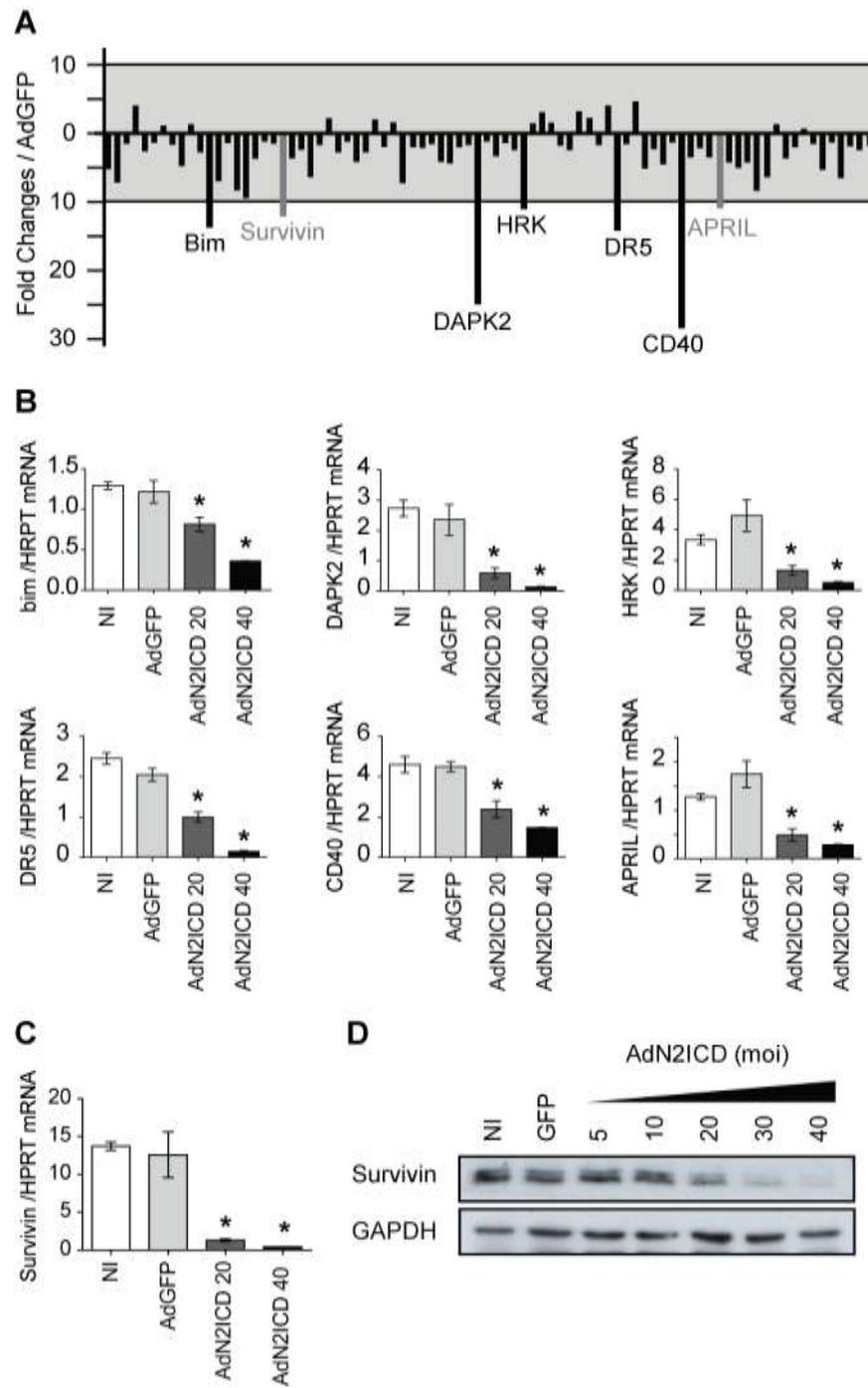


FIGURE 5

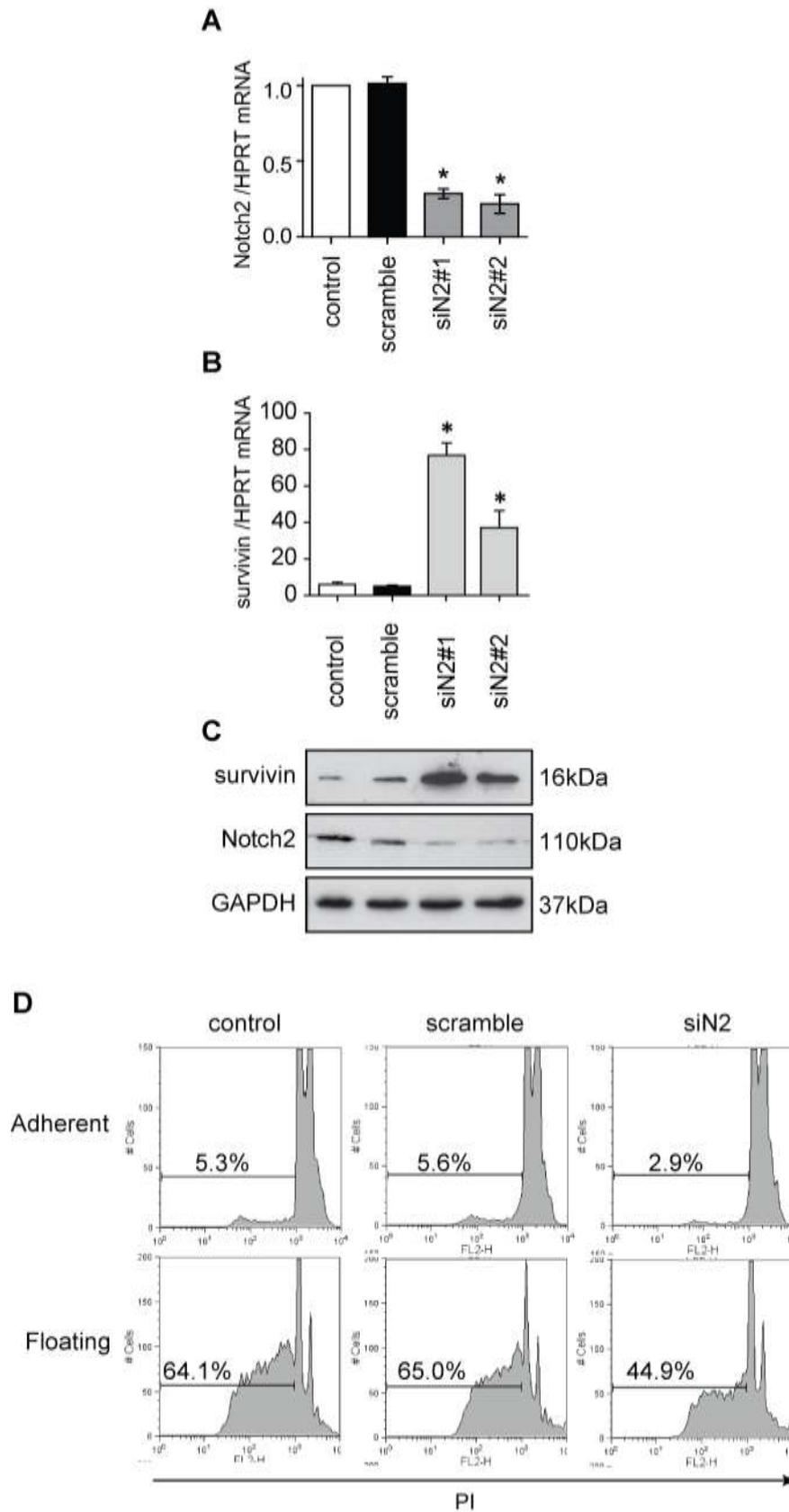
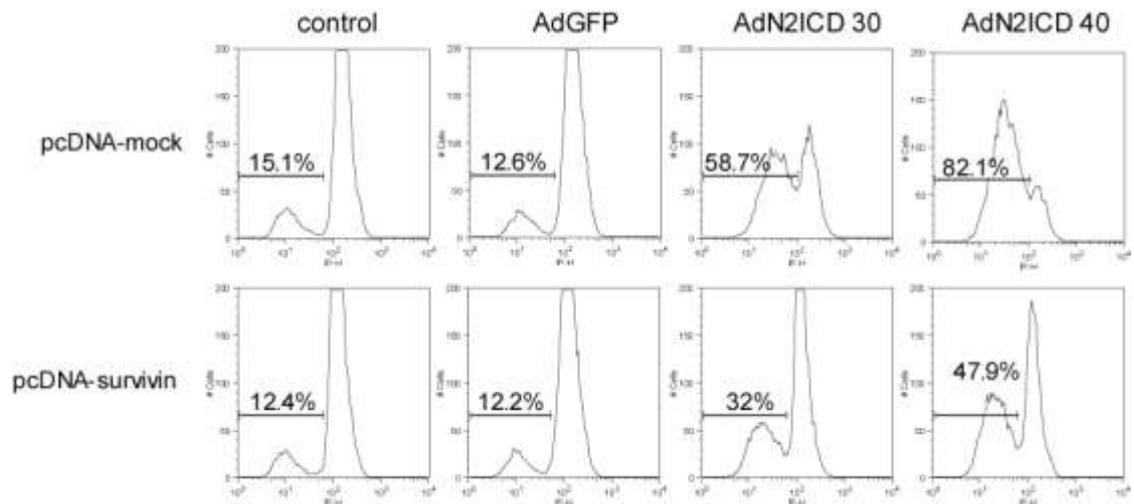


FIGURE 6



Discussion

Notch & Immunologie de la Transplantation

La voie de signalisation Notch joue un rôle majeur dans le contrôle de différenciation, la prolifération et la survie de nombreux types cellulaires. L'implication de cette voie en immunologie et plus particulièrement en Transplantation a déjà été abordée par de précédentes études. Au un niveau central tout d'abord, il est clairement établi aujourd'hui que Notch permet d'orienter la différenciation des lymphocytes T (LT) et B (LB), des monocytes, des cellules dendritiques ou encore des cellules NK (Ohishi K. 2001; Weijzen S. 2002; Maillard I. 2003; Ohishi K. 2003; Pear W.S. 2003; Tanigaki K. 2003; de La Coste A. 2005; De Smedt M. 2005; Minato Y. 2005; Murata-Ohsawa M. 2005; Pennington D.J. 2005; Jenkinson E.J. 2006; Besseyrias V. 2007; De Smedt M. 2007; Cheng P. 2008). De plus, notamment pour les LT, Notch est impliqué dans toutes les étapes de différenciation, du précurseur hématopoïétique aux cellules effectrices, en passant par les stades double négatif (DN CD4⁻ CD8⁻) 2, 3, 4 puis double positif (DP CD4⁺ CD8⁺) pour finir sur les cellules simples positives CD4⁺ ou CD8⁺. Au stade DN2, Notch participe également à l'orientation des lignages T $\gamma\delta$ et $\alpha\beta$ (Maillard I.

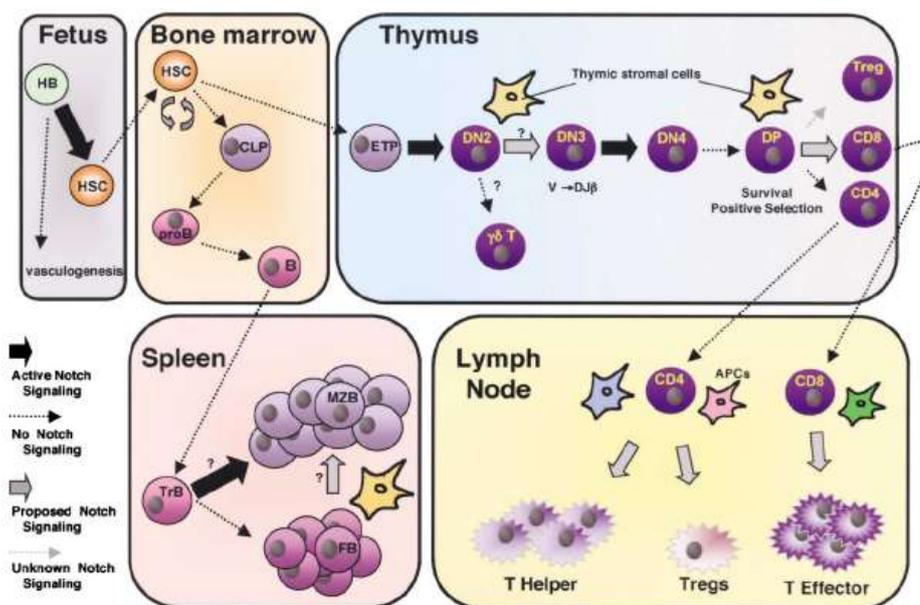


Figure 38. Implication de la voie Notch dans le développement des cellules immunitaires (D'après Ivan Maillard et al, 2003)

2003).

En dehors de ces fonctions centrales, Notch joue également un rôle important dans la maturation et l'activation des cellules immunitaires en périphérie et de ce fait est un acteur de la réponse immune dirigée contre le greffon en Transplantation.

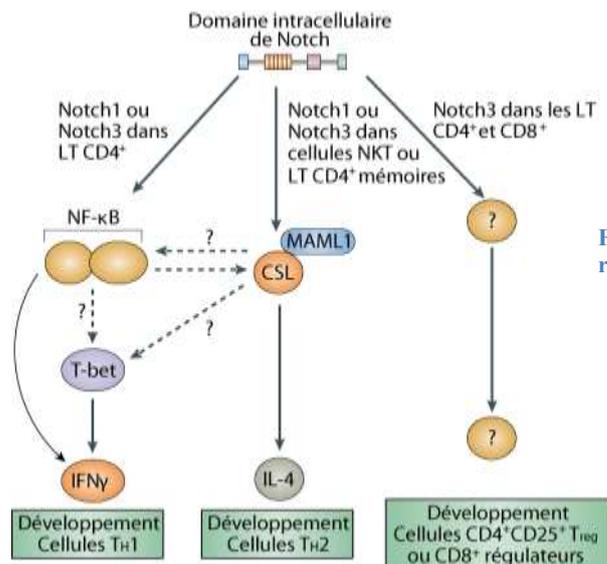


Figure 39. Rôle de Notch dans l'orientation de la réponse immunitaire médiée par les Lymphocytes T (D'après Barbara A. Osborne and Lisa M. Minter, 2007)

En effet, l'activation de Notch, que ce soit par la surexpression du domaine intracellulaire ou par surexpression de ligands par les CPA, permet de moduler la maturation et l'activation des lymphocytes (Osborne B.A. 2007). Pour ce qui est des lymphocytes T CD4⁺ qui sont les plus étudiés, Notch1 et Notch3, *via* Dll1, Dll4 et Jag1 par les CPA, orientent la maturation des CD4⁺ helper en cellules Th1 ou Th2 et régulent leur activation (Maekawa Y. 2003; Amsen D. 2004; Minter L.M. 2005; Rutz S. 2005; Amsen D. 2007; Wakui M. 2007; Liotta F. 2008; Sun J. 2008).

Un autre aspect très étudié est la capacité de Notch à générer des populations CD4⁺ et CD8⁺ régulatrices capables d'induire la tolérance immunitaire aux antigènes portés par les CPA. C'est en 2000 que Hoyne *et al* montre pour la première fois chez la souris que l'injection de CPA surexprimant le ligand Jag1 permet l'inhibition de la prolifération et la production d'IL2 et d'IFN γ des lymphocytes. Cet effet, spécifique des antigènes présentés par ces CPA, est transférable par la LT CD4⁺ à des souris naïves, suggérant que Jag1 surexprimé par les CPA pourrait induire des LT CD4⁺ régulateurs (Hoyne G.F. 2000). Ce résultat prometteur a ensuite été confirmé dans un contexte allogénique (Yvon E.S. 2003). Notch3 est impliqué dans cette orientation phénotypique. Les souris transgéniques pour le domaine intracellulaire de Notch3 montrent un pourcentage élevé de lymphocytes T CD4⁺CD25⁺ régulateurs et sont réfractaires à l'induction de diabète auto-immun expérimental induit par la streptozotocine (Anastasi E. 2003). Pour ce qui est de l'impact de la voie Notch sur la survie de greffe, la surexpression du ligand Dll1 permet de prolonger significativement la survie d'allogreffe cardiaque, avec cette fois une implication des LT CD8⁺ et non CD4⁺ dans les mécanismes de suppression de la réponse anti-greffon (Wong K.K. 2003).

Le rôle de la voie Notch dans la génération de CD tolérogènes et de cellules T régulatrices permettant de bloquer la réponse immune a fait l'objet de nombreuses études mais les mécanismes restent encore mal caractérisés (Kared H. 2006; Ostroukhova M. 2006; Asano N. 2008; Li Y.P. 2008; Samon J.B. 2008). En transplantation, l'ensemble des données montrant le rôle de Notch dans la différenciation des cellules immunitaires et la génération de LT régulateurs suggère des applications cliniques pour palier la déficience en LT observée chez les individus immunodéprimés comme après la transplantation (Awong G.n.v. 2007; Dallas M.H. 2007) et surtout pour induire la tolérance au greffon en favorisant le développement de populations régulatrices.

En revanche, la place de Notch porté par les cellules vasculaires, en particulier les CE qui jouent un rôle central dans les mécanismes de rejet de greffe, n'a pas été étudiée à ce jour. Aux vues de ces données suggérant le rôle de Notch dans la maturation et l'activation des cellules immunitaires dans le contexte de la Transplantation, nous avons entrepris de caractériser l'implication de cette voie dans l'activation et la dysfonction endothéliale qui participent à la présentation des antigènes du greffon, à la réponse anti-greffon et au développement de l'artériosclérose.

Expression constitutive et Régulation de la voie Notch par des facteurs solubles

Alors que l'impact de la voie Notch dans certains aspects de la biologie endothéliale est aujourd'hui relativement bien établi, son rôle dans l'inflammation et dans l'activation endothéliale qui en résulte reste à être élucidé. Pour l'instant, les études principalement restreintes à des modulations d'activité de la voie Notch ont pu montrer que Notch était impliqué dans la différenciation, la prolifération et l'apoptose des CE (MacKenzie F. 2004; Nosedá M. 2004; Nosedá M. 2004). De plus, de précédents travaux ont étudié l'impact de facteurs solubles angiogéniques (VEGF, bFGF) ou de différenciation (TGF β) sur les molécules de la voie Notch dans plusieurs types cellulaires, suggérant d'importantes relations entre ces différentes voies (Liu Z.J. 2003; Hiratochi M. 2007).

Dans un premier temps, nous avons donc étudié quelles pouvaient être les effets de médiateurs solubles de l'inflammation sur le profil d'expression de la voie Notch dans les CE vasculaires. Pour ce faire, nous avons d'abord analysé l'expression des récepteurs, ligands et gènes effecteurs de Notch en réponse aux cytokines inflammatoires.

Chez les mammifères, 4 récepteurs Notch, Notch1, 2, 3 et 4, associés à 5 ligands différents Jag1, 2 et Dll1, 3, 4 ont été identifiés. Alors qu'initialement, Notch3 a été décrit comme restreint aux CML dans les vaisseaux sanguins (Joutel A. 2000), nous avons détecté la présence de ce récepteur dans les CE au repos. Comme décrit dans de précédentes études, les CE quiescentes expriment *in vivo* et *in vitro* toutes les molécules de la voie Notch (Iso T. 2003). Dans cette première étude, nous avons pu montrer que le TNF et l'IL1 β induisent une régulation spécifique de la voie Notch dans les CE et les CML vasculaires. Dans les CE artérielles, le TNF induit une forte modulation du profil d'expression

Notch en diminuant l'expression transcriptionnelle et protéique de Notch3 et Notch4 tout en induisant celle de Notch2 et Dll1.

L'activité constitutive de la voie Notch, attestée par notre système rapporteur dépendant de CBF1 ainsi que par l'expression basale des molécules effectrices *Hairy/Enhancer of split* (Hes) et les facteurs de transcription Hairy-related (Hey, aussi appelées hrt; Hesr, CHF, grl, et Herp), associée à l'expression basale des récepteurs et ligands de Notch, suggère des interactions Notch entre CE adjacentes et pourrait être impliquée dans le maintien et le contrôle du maintien de la quiescence du tapis endothélial (Nosedo M. 2004).

Au cours de l'activation endothéliale par le TNF ou l'IL1 β , Notch2 et Hey1 sont respectivement activés et induits mais l'activité globale de la voie Notch dépendante de CBF1 est fortement inhibée dans les CE traitées par les cytokines inflammatoires, également reflétée par la baisse de la transcription de Hes1 et de Hey2.

Ces résultats montrent donc que dans les cellules activées par les cytokines inflammatoires, un déséquilibre du profil d'expression de la voie Notch est induit, caractérisé par la diminution de l'expression de Notch3 et Notch4 associée à la baisse de Hes1 et de l'activité globale de la voie d'une part, et d'autre part, par l'induction/activation de Notch2, potentiellement via Dll1 et reflétée par Hey1. Cette observation suggère également que les gènes effecteurs Hes1 et Hey1 sont sous le contrôle sélectif de récepteurs Notch distincts dans les CE (Shimizu K. 2002; Iso T. 2003).

Rôle de la voie Notch dans l'inflammation

Le rôle de la voie Notch dans l'inflammation reste à ce jour très peu étudié. Un des modèles qui a pour autant déjà permis de relier Notch à ce contexte biologique est le modèle pathologique de l'arthrite rhumatoïde (AR). L'AR est une maladie inflammatoire systémique associée à une inflammation progressive de la synovie caractérisée par la prolifération invasive des cellules synoviales (synoviocytes) et aboutissant à une destruction cartilagineuse et osseuse (Feldmann M. 2001). Dans le cadre de cette pathologie, Nakazawa *et al* rapportent en 2001 que Notch1 est anormalement activé dans les synoviocytes rhumatoïdes (Nakazawa M. 2001). En 2003, Ando *et al* étudient les régulations transcriptionnelles de la voie Notch en réponse au TNF dans les fibroblastes synoviaux rhumatoïdes (RSF) et les comparent aux fibroblastes synoviaux normaux (NSF). Les auteurs démontrent qu'en réponse au TNF, les transcrits de Notch1 et Notch4 sont sous-exprimés après 24h de stimulation au TNF, confirmant nos résultats obtenus dans les CE. De même, aucune régulation de Jag2 n'est observée dans les cellules normales traitées au TNF. Ils montrent également que les RSF présentent des régulations différentes de Notch, suggérant que le TNF induit des effets sur la voie Notch pouvant être spécifiques en fonction des types cellulaires ou/et des contextes biologiques étudiés (Ando K. 2003). Considérant l'hétérogénéité des CE, notamment artérielles et veineuses, nous

avons observé que la régulation de Dll1 diffère entre les HAEC et les HUVEC. Alors que Dll1 est induit dans les HAEC, ce ligand est moins exprimé après une stimulation de 24h au TNF dans les HUVEC. De manière comparable, alors que Jag2 n'est pas régulé dans les HAEC, il est retrouvé induit par le TNF et le LPS dans les CE de la moelle osseuse (Fernandez L. 2008).

Les profils d'expression mais également la régulation des ligands et récepteurs de la voie Notch dans des contextes cellulaires données sont donc susceptibles d'orienter spécifiquement les fonctions assurées par Notch (ex. différenciation de progéniteurs dans la moelle osseuse, prolifération, apoptose, activation...). Toutefois, les nombreuses régulations communes pour les récepteurs Notch dans les CE et les CML, en réponse aux différentes cytokines inflammatoires indiquent une relevance physiologique dans l'inflammation pour l'induction de Notch2 et la diminution de Notch3 et Notch4 associée à la baisse de l'activité globale de la voie.

En effet, tout comme nous l'avons observé, de récents travaux rapportent la régulation négative de Notch3 et des gènes-effecteurs Hes et Hey de Notch par l'IL1 β ou le TNF dans les CML et les fibroblastes (Espinosa L. 2003; Aguilera C. 2004; Clement N. 2007). Cette diminution est impliquée dans la transition du phénotype inflammatoire des CML induite par l'IL1 β et le TNF qui perdent dès lors leur capacité contractile et sécrète des médiateurs de l'inflammation tels que PGE2 et PLA2. Enfin, dans les macrophages, c'est le ligand Dll4, initialement décrit comme restreint à l'endothélium, qui est induit par le LPS, l'IL1 β ou les LDL modifiés. Probablement en association avec les récepteur Notch2 et Notch3, également induits, il participe ainsi à la réponse inflammatoire en induisant l'expression de gènes pro-inflammatoires tels que iNOS, pentraxine-3, Id-1 et en activant les voies MAPK, PI₃K/Akt et NF κ B (Fung E. 2007; Kim M.Y. 2008).

Cette dernière observation indique par ailleurs d'étroites relations entre les voies « classiques » de signalisation MAPK, PI₃K et NF κ B avec la voie Notch. Ces relations sont d'autant plus importantes que ce sont ces voies et plus particulièrement NF κ B qui sont impliquées dans les régulations de Notch en réponse à l'inflammation.

Interactions et régulations croisées entre les voies Notch et NF κ B

Les voies NF κ B et Notch présentent d'importants niveaux de rétro-contrôle. Tout d'abord, Notch1 semble pouvoir inhiber NF κ B p50 (et non p65) en jouant le rôle de molécules I κ B. Par interaction directe dans le noyau, il empêche la fixation de p50 à l'ADN et donc sa fonction de facteur de transcription (Wang J. 2001). De plus, le répresseur CBF1 est capable d'interagir avec un site de liaison reconnu par CBF1 et NF κ B au niveau du promoteur de I κ B α , réprimant donc son expression et favorisant l'activation de NF κ B (Oakley F. 2003). Réciproquement, la séquestration cytoplasmique de p65 par I κ B α induit la translocation des co-répresseurs du complexe transcriptionnel de la voie Notch (SMRT/N-CoR) du noyau dans le cytoplasme pour permettre l'augmentation de l'expression des gènes-cibles de Notch (Espinosa L. 2003). En résumé, alors que l'activation de la voie Notch *via*

Notch1ICD inhibe NFκB en séquestrant p50 et en induisant l'expression de IκBα, l'inactivation de NFκB semble quant à elle être associée à une forte activité de la voie Notch, suggérant une boucle de rétro-contrôle négatif entre ces 2 voies.

Au cours de l'activation endothéliale induite par le TNF, la voie NFκB est précisément activée par la phosphorylation de IκBα par IKK, qui est ensuite dégradé pour permettre la translocation nucléaire de p50 et p65. En parallèle, associée à la diminution d'expression de Notch3 et de Notch4, nous avons observé en réponse au TNF une forte baisse de l'expression de Hes1 et de l'activité globale dépendante de CBF1 dans les CE.

Nous avons donc dans un premier temps testé si les régulations de Notch observées étaient dépendantes de l'activation de NFκB. En utilisant les inhibiteurs chimiques PDTC et NAC, nous avons ainsi pu démontrer que la diminution de Notch4, de Hes1 et de l'activité globale de la voie Notch était médiée par NFκB. Une régulation similaire de Hes1 par le TNF a déjà été rapportée dans les lignées cellulaires de fibroblastes et de cellules épithéliales NIH-3T3 et HEK293T (Espinosa L. 2003; Aguilera C. 2004). De manière intéressante, l'activation de NFκB permet une induction de Hes1 dans les temps très précoces de l'activation mais ne module pas la diminution plus tardive (>1h) de Hes1 induite par le TNF (Aguilera C. 2004). Il est donc probable que la baisse d'activité de Notch dans les CE est le reflet de la baisse d'expression de Notch4 (absent dans les fibroblastes et les cellules épithéliales) et non par un mécanisme directement dépendant de NFκB. Cette hypothèse est d'autant plus probable que l'inhibition de Notch4 par les siRNA est suffisante pour provoquer la baisse d'expression de Hes1 et de l'activité de la voie Notch.

Pour ce qui est de Notch3 et Dll1, nos résultats montrent également une implication des voies NFκB et JNK MAPK dans leur régulation par le TNF et confirment les connexions entre ces voies de signalisation (Zecchini V. 1999 ; Liao Y.F. 2004; Kim J.W. 2005; Curry C.L. 2006). Enfin, nous montrons que l'induction de Notch2 et Hey2 est strictement dépendante de l'activation de la PI₃K.

L'ensemble de ces résultats montrent donc les relations entre la voie du TNF qui induit l'activation dans les CE de NFκB, de la PI₃K et des MAPK et la voie Notch. De plus, les régulations opposées et sélectives de Notch2 et Notch4 associées respectivement à Hey1 et Hes1, suggèrent fortement des rôles spécifiques de ces 2 récepteurs dans le contexte de l'activation et de la dysfonction endothéliale médiée par le TNF.

Rôles de Notch dans les Cellules Endothéliales : relevance fonctionnelle en Transplantation

Afin de tester la relevance de ces régulations en transplantation dans le contexte de l'AG où la dysfonction joue un rôle majeur, nous avons analysé la régulation des récepteurs Notch au cours du développement de l'artériosclérose d'allogreffe cardiaque. Nous avons ainsi pu démontrer dans ces greffons artériosclérotiques que la voie Notch était affectée à travers une diminution de l'expression de Notch2, Notch3 et Notch4 par rapport aux greffons syngéniques ou tolérants. A la différence de Notch2 et Notch3, exprimés par de nombreux types cellulaires, notamment les cellules musculaires cardiaques et lisses, Notch4 est restreint à l'endothélium. Cette diminution spécifique de Notch4 dans l'endothélium des greffons artériosclérotiques est associée à une augmentation de l'expression de VCAM1, une molécule d'adhésion principalement exprimée par les CE activées. De plus l'AG est associée à de forte expression des cytokines pro-inflammatoires TNF, IL10 et TGF β par les cellules du greffon, comme précédemment décrit (Furukawa Y. 1999; Suzuki J. 2003). Aux vues des résultats que nous avons déjà obtenus montrant l'effet du TNF sur l'expression de Notch4, nous postulons donc que la baisse de Notch4 dans l'endothélium est médiée par les cytokines inflammatoires produites au cours de l'AG. En effet, un traitement in vitro de CE par le TNF, l'IL10 ou le TGF β induit une forte baisse de l'expression de Notch4 et ainsi qu'une forte diminution de l'expression de Hes1 et de l'activité de Notch dépendante de CBF1.

Nous ne pouvons toutefois exclure qu'une perte partielle des CE au cours de l'AG pourrait également contribuer à la baisse d'expression de Notch4. Toutefois, le fort marquage immunohistologique de PECAM-1 dans les tissus avec artériosclérose ne semble pas totalement soutenir cette hypothèse.

La modification du profil d'expression et d'activité de Notch semble donc caractéristique d'un contexte inflammatoire associé à une activation et une dysfonction des CE (cf introduction sur AG).

Implication Fonctionnelle de Notch4 dans l'Artériosclérose du Greffon

Alors que ces données confirment un rôle des cytokines inflammatoires dans la régulation de la voie Notch, elles posent également la question des mécanismes par lesquels cette régulation de Notch peut affecter les fonctions endothéliales et ainsi contribuer au remodelage vasculaire. Les CE sont une cible cellulaire commune pour tous les événements impliqués dans l'initiation et le développement de l'AG (épisodes de rejet aigu, inflammation, cytotoxicité associée aux traitements IS). L'activation chronique, l'apoptose et les lésions intimes résultantes jouent un rôle majeur dans le processus de remodelage vasculaire (Cailhier J.F. 2006; Mitchell R.N. 2007). Pour définir comment la diminution de Notch4 et de l'activité de Notch *via* Hes1 qui en résulte, pourrait fonctionnellement jouer sur le développement de l'AG, nous avons abolit l'expression de Notch4 ou de Hes1 avec des ARN interférant (siRNA) spécifiques. Grâce à ces outils, nous démontrons que le blocage de Notch4 ou Hes1 suffit à induire l'activation des CE reflétée par l'induction d'expression des molécules VCAM1 et la E-sélectine à la surface des CE. De plus, l'activation par le TNF des CE dans lesquelles Notch4

est absent est également nettement augmentée. Le recrutement des cellules immunitaires dans le greffon requiert leur adhérence sur les CE vasculaires activées par liaison avec de des molécules d'adhérences telles que ICAM-1, VCAM-1, E- et P-sélectines et ce mécanisme est fortement associé aux rejets aigus et à l'AG (Ardehali A. 1995). Dès lors, ces résultats indiquent que Notch4 contrôle au moins en partie l'expression de molécules d'adhérence cruciales pour le recrutement dans le greffon des leucocytes mais également des progéniteurs de CML circulants, deux évènements initiateurs des lésions artériosclérotiques (Moiseeva E.P. 2001). De plus, en activant mais également en potentialisant l'activation endothéliale induite par les cytokines inflammatoires, Notch4 pourrait largement contribuer au maintien de la dysfonction endothéliale à l'origine du remodelage vasculaire et qui aboutit finalement à la perte du greffon (Cailhier J.F. 2006). De manière intéressante, l'induction de ces molécules d'adhérences est principalement dépendante de l'activation de la voie NFκB. Ces résultats suggèrent donc que l'inhibition de Notch4 pourrait induire l'activation de NFκB, confirmant l'hypothèse d'une inhibition réciproque de ces 2 voies de signalisation.

Dans les CE, l'expression constitutive du domaine actif de Notch4 (N4ICD) dans les CE induit l'EMT, bloque le cycle cellulaire et protège de l'apoptose (Leong K.G. 2002; MacKenzie F. 2004; Nosedá M. 2004; Nosedá M. 2004). Alors que la pertinence physiologique de ces études reste controversée dans les CE (Liu Z.J. 2003; Hainaud P. 2006), elles montrent toutefois les fonctions intrinsèques et les partenaires de Notch4 dans les CE, tout en éclairant sur les mécanismes impliqués dans des pathologies où une activation aberrante de Notch4 est retrouvée (Uyttendaele H. 2001; Ando K. 2003; Sun Y. 2005; Gramantieri L. 2007; Gao J. 2008). En accord avec ces résultats, nos données montrent que l'inactivation de Notch4 provoque la mort cellulaire par apoptose *et al* tère la capacité de cicatrisation des CE sans avoir d'effet visible sur la prolifération. De plus, ces résultats sont retrouvés pour les CE pour lesquelles l'activité de Notch *via* Hes1 est inhibée grâce aux siRNA spécifiques de Hes1. Le blocage de Notch4 étant par ailleurs suffisant pour induire une forte baisse de Hes1, il semblerait que les fonctions de Notch4 soient principalement assurées par le gène-effecteur Hes1. De manière intéressante, les résultats décrits ici pour Notch4 et Hes1 dans les CE sont en adéquation avec les approches ciblant Notch par l'emploi des inhibiteurs de γ -sécrétase qui montrent un ralentissement des processus cicatriciels des kératinocytes et des fibroblastes (Chigurupati S. 2007), l'induction d'apoptose dans le sarcome de Kaposi (Curry C.L. 2005) et dans le myélome multiple (Nefedova Y. 2008).

Toutefois, alors que la voie Notch a été fortement impliquée dans la régulation de l'angiogenèse et dans la différenciation artério-veineuse au cours du développement, aucun effet visible sur la viabilité endothéliale n'a été observée dans les souris déficientes pour Notch4. A l'instar des profonds défauts du développement vasculaire létaux observés dans les souris surexprimant N4ICD dans l'endothélium, le phénotype de ces souris Notch4^{-/-} est viable et fertile sans altération visible de la fonction vasculaire (Krebs L.T. 2000; Uyttendaele H. 2001). L'étude combinée des souris déficientes pour Notch1 et

Notch4 a permis de mettre en évidence des fonctions redondantes compensatoires pour ces 2 récepteurs Notch. En effet, les souris Notch1^{-/-} montrent d'importants défauts de la vasculogenèse, défauts exacerbés si l'inactivation de ce gène est restreinte à l'endothélium, suggérant que Notch1 dans les CE est critique pour le développement vasculaire et la viabilité de l'embryon (Limbourg F.P. 2005). Néanmoins, la double inactivation de Notch1 et Notch4 induit un phénotype plus sévère que les souris Notch1^{-/-}, indiquant que Notch1 et Notch4 présentent des rôles communs dans le remodelage vasculaire embryonnaire (Krebs L.T. 2000). Chez l'adulte, les rôles respectifs de Notch1 et de Notch4 dans les CE restent encore mal caractérisés. En effet, dans notre modèle d'AG et *in vitro* (avec les siRNA et en réponse au TNF), il ne semble pas que Notch1 puisse un rôle compensatoire quelconque vis-à-vis de l'inhibition de Notch4 étant donné qu'aucune modification significative d'expression de Notch1 n'a été observée.

En conclusion, nous montrons par ces résultats que la diminution de Notch4 durant l'AG et dans les CE en réponse aux cytokines inflammatoires conduit à la dysfonction endothéliale et suggère ainsi que l'activation basale de Notch4 et l'expression de Hes1 résultante est nécessaire pour maintenir la quiescence des CE et favoriser leur survie et leur capacité réparatrice en réponse à des lésions intimes.

Rôle de Notch2 dans l'apoptose des cellules endothéliales

Notch2 est le deuxième récepteur Notch à avoir été identifié chez les mammifères en 1992 (Weinmaster G. 1992). Exprimé par de nombreux types cellulaires, il n'est cependant pas très étudié en comparaison des autres récepteurs Notch. Nécessaire pendant le développement embryonnaire, il est impliqué chez l'adulte dans la différenciation, la prolifération et l'apoptose.

Notre première étude a d'abord permis de montrer que Notch2 est exprimé et activé de manière constitutive dans les CE. Au cours de l'activation endothéliale par le TNF, l'IL1 β ou l'IFN γ , Notch2 est surexprimé et suractivé et cette stimulation est associée à l'induction du gène effecteur Hey1, suggérant que Hey1 est un gène effecteur sélectivement induit par N2ICD. A l'aide d'un adénovirus codant pour le domaine intracellulaire actif de Notch2 (N2ICD), nous avons testé la relevance fonctionnelle de cette surexpression dans la dysfonction des CE.

Dans un premier temps, nous avons observé que la surexpression du N2ICD dans les CE induit une baisse importante de la viabilité endothéliale par l'induction d'apoptose ainsi qu'une baisse de la prolifération (non montré). Alors que l'effet anti-prolifératif de Notch2 a déjà été observé dans les CE (Curry C.L. 2006), nos résultats confirment également un rôle majeur de ce récepteur dans le contrôle de la survie et l'apoptose cellulaire. Ainsi, tout comme dans les CE, Notch2 est pro-apoptotique au cours de l'apoptose interdigitale et dans le cancer du sein et de la peau (Parr C. 2004; Pan Y. 2005; O'Neill C.F. 2007). A l'inverse, Notch2 peut toutefois jouer un rôle anti-apoptotique et pro-tumorale

dans d'autres contextes cellulaires (leucémie B, tumeur cérébrale) voire dans les mêmes (cancer du sein) (Hubmann R. 2002; Fan X. 2004; Florena A.M. 2007). Les rôles pro- ou anti-tumoraux de Notch2 sont donc encore très controversés et font vraisemblablement intervenir d'autres molécules pour spécifier la fonction de ce récepteur.

A l'aide d'une puce à qRT-PCR dédiée à l'apoptose, nous avons identifié 7 gènes très fortement réprimés par N2ICD et impliqués dans la survie et l'apoptose cellulaire. A l'inverse, aucun des 88 gènes testés n'a été retrouvé fortement induit par Notch2. Il semble donc que Notch2 *via* la voie canonique de Notch et par les gènes effecteurs Hes/Hey régule directement ces gènes. Parmi les gènes Hes/Hey, Hey1 et non Hey2 ni Hes1 est induit par N2ICD suggérant, là encore, la sélectivité des gènes effecteurs en fonction d'un NICD donné (Irvin D.K. 2001; Iso T. 2003). Hey1 appartenant à la grande famille des répresseurs de la transcription HLH, il est donc probable que la régulation négative des gènes pro- (Bim, DAPK2, HRK, DR5 et CD40) et anti-apoptotiques (Survivine, April) en réponse à la surexpression de N2ICD soit dépendante de l'induction de Hey1. Une étude préliminaire des séquences promotrices de ces gènes a d'ailleurs mis en évidence la présence de sites consensus de liaison des gènes Hes et Hey, confirmant l'hypothèse de leur régulation directe par la voie Notch.

En considérant le rôle apoptotique et l'effet anti-prolifératif de Notch2 dans les CE, il apparaît donc que parmi ces gènes, la survivine semble jouer un rôle majeur dans ces fonctions contrôlées en amont par Notch2.

La survivine est une protéine inhibitrice de l'apoptose (*inhibitor of apoptosis protein*, IAP) qui est surexprimée dans de nombreux cancers et a récemment été décrite dans les lésions vasculaires (Blanc-Brude O.P. 2002). Initialement détectée dans les tumeurs, cette protéine a été ensuite décrite dans de nombreux tissus normaux adultes mais à des niveaux nettement plus faibles que dans les cellules cancéreuses. La survivine joue un rôle crucial dans la régulation de la division cellulaire et la préservation de la survie cellulaire. La perte de son expression induit de ce fait une létalité à un stade très précoce du développement embryonnaire (Altieri D.C. 2003). La démonstration que le niveau d'expression de la survivine peut être augmenté par des cytokines dans les tissus normaux suggèrent que la survivine a un rôle physiologique dans le contrôle de la prolifération et de la survie cellulaire (Altieri D.C. 2008). Même si l'existence de complexes fonctionnels survivine-caspase reste controversé, sa capacité à inhiber l'apoptose a été clairement établie (Romagnoli M. 2007). Ainsi, l'expression de cette protéine protège des cellules normales ou transformées de l'apoptose (Altieri D.C. 2006) et son expression forcée inhibe divers formes de mort cellulaire à la fois *in vivo* et *in vitro* (Altieri D.C. 2003). Au niveau endothélial, l'absence de survivine est létale pour l'embryon. Ces embryons mutants développent d'importantes hémorragies à partir du stade 9.5 (E9.5) et meurent avant E13.5 (Zwerts F. 2007). Dans les CE adultes, son expression est inhibée par le TNF et l'IFN γ , et d'autre part, sa surexpression dans CML et les CE est capable de complètement prévenir l'apoptose

induite par des traitements aux cytokines inflammatoires ($\text{IFN}\gamma$, TNF, $\text{IL1}\beta$) ou au TNF et cycloheximide, respectivement (O'Connor D.S. 2000; Wang G.J. 2005).

De manière complémentaire à ces études, nos résultats montrent que Notch2 induit l'apoptose des CE en réprimant la survivine. En effet, le blocage de la répression de la survivine par Notch2 suffit à bloquer très efficacement l'apoptose induite par Notch2. Par contre, l'expression ectopique de la survivine ne permet pas de restaurer la prolifération normale des CE, suggérant un rôle sélectif de cette protéine dans la survie et non la prolifération des CE, tout du moins en réponse à l'activation de Notch2. A l'inverse, l'inhibition de Notch2 par siRNA est associée à une augmentation d'expression de la survivine et permet de protéger les CE de l'apoptose par anoïkis. Nos résultats montrent donc bien la relation entre Notch2 et la survivine et l'implication de ce lien dans le contrôle de l'apoptose dans les CE.

Rôles et Régulation spécifiques des récepteurs Notch

L'ensemble de nos données montrent donc des rôles distincts des récepteurs Notch dans les CE. Comme suggéré par la régulation différentielle des récepteurs au cours de l'activation endothéliale, qui plus est par des voies de signalisation différentes, Notch2 et Notch4 jouent des rôles opposés dans ce contexte cellulaire donné. En particuliers, notre étude montre le rôle pro-apoptotique de Notch2, via la répression de la survivine alors que Notch4 est nécessaire pour maintenir une survie optimale des CE. De précédents travaux ont de plus montré que l'activation de Notch4 protège de l'apoptose, bloque la prolifération, l'angiogenèse et induit la transformation mésenchymateuse des CE (EMT) (Leong K.G. 2002; MacKenzie F. 2004; Nosedà M. 2004; Nosedà M. 2004). Nos résultats renforcent grandement l'hypothèse que les récepteurs Notch exercent des fonctions spécifiques, à la fois intrinsèquement en fonction de la nature NICD lui-même, mais également de par le contexte cellulaire étudié. En effet, la spécificité fonctionnelle de Notch a déjà été démontrée dans le système lymphopoïétique par les modèles génétiques murins dans lesquels la déficience en Notch1 résulte en une altération du développement des lymphocytes T, alors que l'invalidation de Notch2 empêche le développement des cellules B des zones marginales au niveau des organes lymphoïdes (Saito T. 2003). De même, Notch1 et Notch2 ont des rôles opposés dans le développement de tumeurs cérébrales chez l'embryon (Fan X. 2004). Notch2, et non Notch1, est requis pour assurer le bon développement du néphron (Cheng H.T. 2007). En accord avec nos résultats, une récente étude démontre que l'activation de Notch2 et Notch4 dans la lignée cellulaire humaine MDA-MB-231 d'adénocarcinome induit des effets diamétralement opposés, conduisant soit à l'augmentation de l'apoptose pour Notch2, soit à l'augmentation de la tumeur pour Notch4 (O'Neill C.F. 2007). La spécificité fonctionnelle de Notch peut, en outre, faire intervenir des effecteurs n'appartenant pas à la voie canonique de Notch mais également d'autres molécules plus inattendues. En effet, une étude récente de Wu *et al* établit que Notch2 exerce ses fonctions spécifiquement en recrutant le co-activateur de Notch Mastermind Maml1 et non Maml2 ou

Maml3 et suggère dès lors que les co-activateurs Maml pourraient contribuer aux spécificités fonctionnelles des récepteurs Notch (Wu L. 2007).

Ainsi, malgré des homologies de séquences importantes et des rôles communs dans certains contextes particuliers, les différents NICD sont susceptibles de jouer des rôles distincts, voire opposés selon le type cellulaire et l'environnement donné. Il est également établi que les 4 récepteurs Notch n'induisent pas les mêmes gènes effecteurs Hes/Hey (Shimizu K. 2002). Comme suggéré par nos résultats, Hes1 est préférentiellement sous le contrôle de Notch4 alors que Notch2 assure ses fonctions par l'intermédiaire de Hey1. Dès lors, c'est la spécificité des profils d'expression et d'activité des récepteurs, ligands et des gènes-effecteurs de Notch qui vraisemblablement oriente la régulation des gènes-cibles et ainsi les fonctions respectives de Notch dans un modèle donné (Iso T. 2003).

Conclusion & Perspectives

En conclusion, ce travail de thèse a permis de mettre en évidence l'implication de la voie Notch dans la dysfonction endothéliale associée à l'AG. Ainsi, en réponse à l'inflammation, la modification du profil d'expression Notch caractérisé par l'induction de Notch2 et la diminution de Notch4 médiées sélectivement par les voies PI₃K et NFκB suggère des rôles distincts de ces récepteurs dans la dysfonction endothéliale. L'étude fonctionnelle pour ces 2 molécules a permis de démontrer que Notch2 et Notch4 sont tous deux impliqués dans le maintien de la survie des CE. Alors que l'activité de Notch4 *via* Hes1 semble nécessaire pour maintenir un tapis endothélial quiescent, l'activation de Notch2 est quant à elle associée à l'induction d'apoptose en réprimant le gène de la survivine. Toutefois, les CE sont des cellules très résistantes à l'apoptose en faisant intervenir de nombreuses voies de survie (Poher J.S. 2002). Alors que le TNF induit à la fois une baisse de Notch4 et une sur-activation transitoire de Notch2, il est peu actif quant à l'induction d'apoptose dans les CE. L'expression et l'activation constitutive de Notch4 et de Notch2 indique un état d'équilibre dans les CE au repos qui est altéré par les cytokines inflammatoires et résulte sur la sensibilisation des CE activées à l'apoptose. Au cours de l'AG, l'altération de voie Notch par la présence chronique de réactions inflammatoires pourrait dès lors fortement contribuer à la dysfonction endothéliale et ainsi au développement du remodelage vasculaire. Tout en favorisant l'apoptose des CE, la diminution de Notch4, observée au niveau des greffons artériosclérotiques, pourrait également concourir à cette pathologie en altérant la cicatrisation de lésions intimes ainsi qu'en potentialisant l'activation endothéliale et le recrutement des leucocytes ou des progéniteurs de CML.

De nombreuses questions sont soulevées par ce travail et feront l'objet de nouvelles expérimentations. Tout d'abord, comme dit précédemment, le TNF induit relativement difficilement l'apoptose des CE alors que, isolées, et la diminution de Notch4 et l'induction de Notch2 suffisent à altérer efficacement la survie cellulaire. Ce résultat implique que le TNF met en place des voies de survie dans les CE qui compense ce profil pro-apoptotique de Notch. Une autre possibilité réside dans

la cinétique d'activation de Notch2 qui est transitoire en réponse au TNF. De plus, les résultats de la puce dédiée à l'apoptose montrent que Notch2 réprime également très fortement l'expression de molécules pro-apoptotiques, lui conférant un potentiel de gène protecteur. Alors que maintenu activé, Notch2 est clairement délétère pour la survie des CE, il est moins évident qu'une activation transitoire ait les mêmes répercussions fonctionnelles. Les relations entre les fonctions du TNF et de Notch2 seront donc à mieux caractériser pour éclaircir ce point.

D'autre part, la sur-expression de Notch2 dans les CE induit très fortement et de manière sélective l'expression transcriptionnelle de Notch3 (non montré). Outre une boucle de rétro-contrôle de la voie Notch, la régulation de ce récepteur préférentiellement exprimé dans les vaisseaux sanguins par les CML suggère un mécanisme d'EMT déjà décrit pour Notch4. En effet, l'activation de Notch4 induit l'EMT caractérisé par la perte des marqueurs endothéliaux et l'acquisition de caractères musculaires lisses (Nosedà M. 2004). Le rôle de Notch2 dans ce processus fera donc l'objet d'une prochaine étude.

Enfin, concernant le contexte physiopathologique de l'AG, nos résultats montrent que des approches thérapeutiques visant la voie Notch dans sa globalité ne semblent pas très pertinentes. L'emploi d'inhibiteur de γ -sécrétase, seul composé chimique décrit à ce jour comme ayant un impact l'activation de Notch, ne pourrait convenir pour espérer maintenir l'expression de Notch4 et l'activité basale de la voie dans les CE. L'emploi de formes solubles de ligands pourrait être testé, bien que l'adressage aux cellules endothéliales du greffon soit très incertain et que la nature des récepteurs Notch préférentiellement activés par tel ou tel ligand ne soit pas encore déterminé. En effet, selon nos données, il serait préférable de sélectionner un ligand qui active préférentiellement Notch4, et non Notch2, d'autant plus que Notch4 étant restreint à l'endothélium, cette molécule serait plus efficacement adressée aux CE. Le développement d'anticorps anti-Notch4 activateur pourrait de ce fait être une stratégie plus pertinente.

Enfin, dans cette optique de mieux comprendre l'importance endothéliale de Notch dans l'AG, il semble tout à fait probable que les contacts entre CE et cellules circulantes, immunitaires ou progénitrices ainsi que les cellules sous-endothéliales puissent être à l'origine de signalisation Notch. En effet, toutes ces cellules, CE, progéniteurs de la moelle, leucocytes, CD, CML expriment ligands et récepteurs Notch. Etant donné les résultats des études montrant notamment le rôle de Notch dans le contrôle de la différenciation, la prolifération, la maturation et l'orientation des réponses immunitaires, il serait pertinent de considérer ces interactions Notch/ligand potentielles dans les mécanismes de rejet aigu et chronique du greffon afin de mieux estimer l'implication biologique réelle de Notch dans ce contexte pathologique.

Bibliographie

- Aguilera, C., R. Hoya-Arias, et al. (2004). "Recruitment of IkappaBalpha to the hes1 promoter is associated with transcriptional repression." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(47): 16537-42.
- Aird, W. C. (2007). "Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms." *Circ Res* **100**(2): 158-73.
- Allan, J. S., J. K. Choo, et al. (1997). "Cardiac allograft vasculopathy is abrogated by anti-CD8 monoclonal antibody therapy." *Ann Thorac Surg* **64**(4): 1019-25.
- Altieri, D. C. (2003). "Survivin, versatile modulation of cell division and apoptosis in cancer." *Oncogene* **22**(53): 8581-9.
- Altieri, D. C. (2006). "Targeted therapy by disabling crossroad signaling networks: the survivin paradigm." *Mol Cancer Ther* **5**(3): 478-82.
- Altieri, D. C. (2008). "Survivin, cancer networks and pathway-directed drug discovery." *Nat Rev Cancer* **8**(1): 61-70.
- Amsen, D., A. Antov, et al. (2007). "Direct regulation of Gata3 expression determines the T helper differentiation potential of Notch." *Immunity* **27**(1): 89-99.
- Amsen, D., J. M. Blander, et al. (2004). "Instruction of distinct CD4 T helper cell fates by different notch ligands on antigen-presenting cells." *Cell* **117**(4): 515-26.
- Anastasi, E., A. F. Campese, et al. (2003). "Expression of activated Notch3 in transgenic mice enhances generation of T regulatory cells and protects against experimental autoimmune diabetes." *J Immunol* **171**(9): 4504-11.
- Ando, K., S. Kanazawa, et al. (2003). "Induction of Notch signaling by tumor necrosis factor in rheumatoid synovial fibroblasts." *Oncogene* **22**(49): 7796-803.
- Ardehali, A., H. Laks, et al. (1995). "Vascular cell adhesion molecule-1 is induced on vascular endothelia and medial smooth muscle cells in experimental cardiac allograft vasculopathy." *Circulation* **92**(3): 450-6.
- Artavanis-Tsakonas, S., M. D. Rand, et al. (1999). "Notch signaling: cell fate control and signal integration in development." *Science* **284**(5415): 770-6.
- Asahara, T., C. Bauters, et al. (1995). "Synergistic effect of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor on angiogenesis in vivo." *Circulation* **92**(9 Suppl): II365-71.
- Asahara, T., T. Murohara, et al. (1997). "Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis." *Science* **275**(5302): 964-7.
- Asano, N., T. Watanabe, et al. (2008). "Notch1 signaling and regulatory T cell function." *J Immunol* **180**(5): 2796-804.
- Asano, N., T. Watanabe, et al. (2008). "Notch1 signaling and regulatory T cell function." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* **180**(5): 2796-804.
- Aster, J. C., W. S. Pear, et al. (2008). "Notch signaling in leukemia." *Annu Rev Pathol* **3**: 587-613.
- Augustin, H. G., D. H. Kozian, et al. (1994). "Differentiation of endothelial cells: analysis of the constitutive and activated endothelial cell phenotypes." *Bioessays* **16**(12): 901-6.
- Austrup, F., D. Vestweber, et al. (1997). "P- and E-selectin mediate recruitment of T-helper-1 but not T-helper-2 cells into inflamed tissues." *Nature* **385**(6611): 81-3.
- Awong, G. n. v., R. N. La Motte-Mohs, et al. (2007). "Generation of pro-T cells in vitro: potential for immune reconstitution." *Seminars in Immunology* **19**(5): 341-9.
- Axelrod, J. D., K. Matsuno, et al. (1996). "Interaction between Wingless and Notch signaling pathways mediated by dishevelled." *Science* **271**(5257): 1826-32.
- Bardin, A. J. and F. Schweisguth (2006). "Bearded family members inhibit Neuralized-mediated endocytosis and signaling activity of Delta in Drosophila." *Dev Cell* **10**(2): 245-55.
- Barnard, C. N. (1968). "Human cardiac transplantation. An evaluation of the first two operations performed at the Groote Schuur Hospital, Cape Town." *Am J Cardiol* **22**(4): 584-96.
- Bazzoni, G. and E. Dejana (2004). "Endothelial cell-to-cell junctions: molecular organization and role in vascular homeostasis." *Physiol Rev* **84**(3): 869-901.
- Beckers, J., A. Clark, et al. (1999). "Expression of the mouse Delta1 gene during organogenesis and fetal development." *Mech Dev* **84**(1-2): 165-8.
- Bellavia, D., A. F. Campese, et al. (2002). "Combined expression of pTalpha and Notch3 in T cell leukemia identifies the requirement of preTCR for leukemogenesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(6): 3788-93.
- Berdnik, D., T. Torok, et al. (2002). "The endocytic protein alpha-Adaptin is required for numb-mediated asymmetric cell division in Drosophila." *Dev Cell* **3**(2): 221-31.
- Besseyrias, V., E. Fiorini, et al. (2007). "Hierarchy of Notch-Delta interactions promoting T cell lineage commitment and maturation." *The Journal of Experimental Medicine* **204**(2): 331-43.

- Bhisitkul, R. B. (2006). "Vascular endothelial growth factor biology: clinical implications for ocular treatments." *Br J Ophthalmol* **90**(12): 1542-7.
- Birch, K. A., B. M. Ewenstein, et al. (1994). "Prolonged peak elevations in cytoplasmic free calcium ions, derived from intracellular stores, correlate with the extent of thrombin-stimulated exocytosis in single human umbilical vein endothelial cells." *J Cell Physiol* **160**(3): 545-54.
- Blanc-Brude, O. P., J. Yu, et al. (2002). "Inhibitor of apoptosis protein survivin regulates vascular injury." *Nat Med* **8**(9): 987-94.
- Blaumueller, C. M., H. Qi, et al. (1997). "Intracellular cleavage of Notch leads to a heterodimeric receptor on the plasma membrane." *Cell* **90**(2): 281-91.
- Bohana-Kashtan, O., L. Ziporen, et al. (2004). "Cell signals transduced by complement." *Mol Immunol* **41**(6-7): 583-97.
- Bombeli, T., M. Mueller, et al. (1997). "Anticoagulant properties of the vascular endothelium." *Thromb Haemost* **77**(3): 408-23.
- Bombeli, T., B. R. Schwartz, et al. (1999). "Endothelial cells undergoing apoptosis become proadhesive for nonactivated platelets." *Blood* **93**(11): 3831-8.
- Boulday, G., F. Coulon, et al. (2002). "Transcriptional up-regulation of the signaling regulatory protein LNK in activated endothelial cells." *Transplantation* **74**(9): 1352-4.
- Boulday, G., S. Coupel, et al. (2001). "Antigraft antibody-mediated expression of metalloproteinases on endothelial cells. Differential expression of TIMP-1 and ADAM-10 depends on antibody specificity and isotype." *Circ Res* **88**(4): 430-7.
- Bray, S. J., S. Takada, et al. (2008). "The atypical mammalian ligand Delta-like homologue 1 (Dlk1) can regulate Notch signalling in Drosophila." *BMC Dev Biol* **8**: 11.
- Brennan, K., M. Baylies, et al. (1999). "Repression by Notch is required before Wingless signalling during muscle progenitor cell development in Drosophila." *Curr Biol* **9**(13): 707-10.
- Briscoe, D. M., R. S. Cotran, et al. (1992). "Effects of tumor necrosis factor, lipopolysaccharide, and IL-4 on the expression of vascular cell adhesion molecule-1 in vivo. Correlation with CD3+ T cell infiltration." *J Immunol* **149**(9): 2954-60.
- Bruckner, K., L. Perez, et al. (2000). "Glycosyltransferase activity of Fringe modulates Notch-Delta interactions." *Nature* **406**(6794): 411-5.
- Burns, L. J., J. C. Pooley, et al. (1999). "Intercellular adhesion molecule-1 expression in endothelial cells is activated by cytomegalovirus immediate early proteins." *Transplantation* **67**(1): 137-44.
- Busse, R., G. Edwards, et al. (2002). "EDHF: bringing the concepts together." *Trends Pharmacol Sci* **23**(8): 374-80.
- Cailhier, J. F., P. Laplante, et al. (2006). "Endothelial apoptosis and chronic transplant vasculopathy: recent results, novel mechanisms." *Am J Transplant* **6**(2): 247-53.
- Callahan, R. and S. E. Egan (2004). "Notch signaling in mammary development and oncogenesis." *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **9**(2): 145-63.
- Capobianco, A. J., P. Zagouras, et al. (1997). "Neoplastic transformation by truncated alleles of human NOTCH1/TAN1 and NOTCH2." *Mol Cell Biol* **17**(11): 6265-73.
- Castro, B., S. Barolo, et al. (2005). "Lateral inhibition in proneural clusters: cis-regulatory logic and default repression by Suppressor of Hairless." *Development* **132**(15): 3333-44.
- Cermak, J., N. S. Key, et al. (1993). "C-reactive protein induces human peripheral blood monocytes to synthesize tissue factor." *Blood* **82**(2): 513-20.
- Cesarman-Maus, G. and K. A. Hajjar (2005). "Molecular mechanisms of fibrinolysis." *Br J Haematol* **129**(3): 307-21.
- Chaplin, D. D. (2002). "Cell cooperation in development of eosinophil-predominant inflammation in airways." *Immunol Res* **26**(1-3): 55-62.
- Cheng, H. T., M. Kim, et al. (2007). "Notch2, but not Notch1, is required for proximal fate acquisition in the mammalian nephron." *Development* **134**(4): 801-11.
- Cheng, P. and D. Gabilovich (2008). "Notch signaling in differentiation and function of dendritic cells." *Immunol Res* **41**(1): 1-14.
- Chigurupati, S., T. V. Arumugam, et al. (2007). "Involvement of notch signaling in wound healing." *PLoS ONE* **2**(11): e1167.
- Chitnis, A. B. (1995). "The role of Notch in lateral inhibition and cell fate specification." *Mol Cell Neurosci* **6**(6): 311-21.
- Choi, J., D. R. Enis, et al. (2004). "T lymphocyte-endothelial cell interactions." *Annu Rev Immunol* **22**: 683-709.
- Choy, J. C., R. P. Cruz, et al. (2005). "Granzyme B induces endothelial cell apoptosis and contributes to the development of transplant vascular disease." *Am J Transplant* **5**(3): 494-9.
- Choy, J. C., A. Kerjner, et al. (2004). "Perforin mediates endothelial cell death and resultant transplant vascular disease in cardiac allografts." *Am J Pathol* **165**(1): 127-33.

- Chu, K., K. H. Jung, et al. (2008). "Circulating endothelial progenitor cells as a new marker of endothelial dysfunction or repair in acute stroke." *Stroke* **39**(5): 1441-7.
- Clark, P. R., T. D. Manes, et al. (2007). "Increased ICAM-1 expression causes endothelial cell leakiness, cytoskeletal reorganization and junctional alterations." *J Invest Dermatol* **127**(4): 762-74.
- Claxton, S. and M. Fruttiger (2004). "Periodic Delta-like 4 expression in developing retinal arteries." *Gene Expr Patterns* **5**(1): 123-7.
- Clement, N., M. Gueguen, et al. (2007). "Notch3 and IL-1beta exert opposing effects on a vascular smooth muscle cell inflammatory pathway in which NF-kappaB drives crosstalk." *J Cell Sci* **120**(Pt 19): 3352-61.
- Cook, C. L., M. C. Weiser, et al. (1994). "Developmentally timed expression of an embryonic growth phenotype in vascular smooth muscle cells." *Circ Res* **74**(2): 189-96.
- Cooke, J. P., A. H. Singer, et al. (1992). "Antiatherogenic effects of L-arginine in the hypercholesterolemic rabbit." *J Clin Invest* **90**(3): 1168-72.
- Coultas, L., K. Chawengsaksophak, et al. (2005). "Endothelial cells and VEGF in vascular development." *Nature* **438**(7070): 937-45.
- Coupel, S., F. Leboeuf, et al. (2004). "RhoA activation mediates phosphatidylinositol 3-kinase-dependent proliferation of human vascular endothelial cells: an alloimmune mechanism of chronic allograft nephropathy." *J Am Soc Nephrol* **15**(9): 2429-39.
- Croquelois, A., A. Blindenbacher, et al. (2005). "Inducible inactivation of Notch1 causes nodular regenerative hyperplasia in mice." *Hepatology* **41**(3): 487-96.
- Cuevas, I. C., A. L. Slocum, et al. (2005). "Meningioma transcript profiles reveal deregulated Notch signaling pathway." *Cancer Res* **65**(12): 5070-5.
- Curry, C. L., L. L. Reed, et al. (2005). "Gamma secretase inhibitor blocks Notch activation and induces apoptosis in Kaposi's sarcoma tumor cells." *Oncogene* **24**(42): 6333-44.
- Curry, C. L., L. L. Reed, et al. (2006). "Notch-independent regulation of Hes-1 expression by c-Jun N-terminal kinase signaling in human endothelial cells." *Lab Invest* **86**(8): 842-52.
- Dallas, M. H., B. Varnum-Finney, et al. (2007). "Enhanced T-cell reconstitution by hematopoietic progenitors expanded ex vivo using the Notch ligand Delta1." *Blood* **109**(8): 3579-87.
- David-Neto, E., E. Prado, et al. (2007). "C4d-positive chronic rejection: a frequent entity with a poor outcome." *Transplantation* **84**(11): 1391-8.
- de La Coste, A., E. Six, et al. (2005). "In vivo and in absence of a thymus, the enforced expression of the Notch ligands delta-1 or delta-4 promotes T cell development with specific unique effects." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* **174**(5): 2730-7.
- De Renzis, S., J. Yu, et al. (2006). "Dorsal-ventral pattern of Delta trafficking is established by a Snail-Tom-Neuralized pathway." *Dev Cell* **10**(2): 257-64.
- De Smedt, M., I. Hoebeke, et al. (2005). "Different thresholds of Notch signaling bias human precursor cells toward B-, NK-, monocytic/dendritic-, or T-cell lineage in thymus microenvironment." *Blood* **106**(10): 3498-506.
- De Smedt, M., T. Taghon, et al. (2007). "Notch signaling induces cytoplasmic CD3 epsilon expression in human differentiating NK cells." *Blood* **110**(7): 2696-703.
- Deftos, M. L., Y. W. He, et al. (1998). "Correlating notch signaling with thymocyte maturation." *Immunity* **9**(6): 777-86.
- Dong, C., J. E. Wilson, et al. (1996). "Human transplant coronary artery disease: pathological evidence for Fas-mediated apoptotic cytotoxicity in allograft arteriopathy." *Lab Invest* **74**(5): 921-31.
- Donoviel, D. B., A. K. Hadjantonakis, et al. (1999). "Mice lacking both presenilin genes exhibit early embryonic patterning defects." *Genes Dev* **13**(21): 2801-10.
- Drayton, D. L., S. Liao, et al. (2006). "Lymphoid organ development: from ontogeny to neogenesis." *Nat Immunol* **7**(4): 344-53.
- Dvorak, A. M. and D. Feng (2001). "The vesiculo-vacuolar organelle (VVO). A new endothelial cell permeability organelle." *J Histochem Cytochem* **49**(4): 419-32.
- Egan, K. and G. A. FitzGerald (2006). "Eicosanoids and the vascular endothelium." *Handb Exp Pharmacol* (176 Pt 1): 189-211.
- Egan, S. E., B. St-Pierre, et al. (1998). "Notch receptors, partners and regulators: from conserved domains to powerful functions." *Curr Top Microbiol Immunol* **228**: 273-324.
- Eiraku, M., A. Tohgo, et al. (2005). "DNER acts as a neuron-specific Notch ligand during Bergmann glial development." *Nat Neurosci* **8**(7): 873-80.
- Ellisen, L. W., J. Bird, et al. (1991). "TAN-1, the human homolog of the Drosophila notch gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms." *Cell* **66**(4): 649-61.
- Ensminger, S. M., B. M. Spriewald, et al. (2001). "Critical role for IL-4 in the development of transplant arteriosclerosis in the absence of CD40-CD154 costimulation." *J Immunol* **167**(1): 532-41.

- Ensminger, S. M., B. M. Spriewald, et al. (2002). "Indirect allorecognition can play an important role in the development of transplant arteriosclerosis." *Transplantation* **73**(2): 279-86.
- Epstein, S. E., Y. F. Zhou, et al. (1999). "Infection and atherosclerosis: emerging mechanistic paradigms." *Circulation* **100**(4): e20-8.
- Esper, E., S. Glagov, et al. (1997). "Role of hypercholesterolemia in accelerated transplant coronary vasculopathy: results of surgical therapy with partial ileal bypass in rabbits undergoing heterotopic heart transplantation." *J Heart Lung Transplant* **16**(4): 420-35.
- Espinosa, L., J. Ingles-Esteve, et al. (2003). "IkappaBalpha and p65 regulate the cytoplasmic shuttling of nuclear corepressors: cross-talk between Notch and NFkappaB pathways." *Mol Biol Cell* **14**(2): 491-502.
- Fan, X., I. Mikolaenko, et al. (2004). "Notch1 and notch2 have opposite effects on embryonal brain tumor growth." *Cancer Res* **64**(21): 7787-93.
- Feldmann, M. (2001). "Pathogenesis of arthritis: recent research progress." *Nat Immunol* **2**(9): 771-3.
- Feletou, M. and P. M. Vanhoutte (2006). "Endothelium-derived hyperpolarizing factor: where are we now?" *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **26**(6): 1215-25.
- Feng, D., J. A. Nagy, et al. (2002). "Ultrastructural studies define soluble macromolecular, particulate, and cellular transendothelial cell pathways in venules, lymphatic vessels, and tumor-associated microvessels in man and animals." *Microsc Res Tech* **57**(5): 289-326.
- Fernandez-Majada, V., C. Aguilera, et al. (2007). "Nuclear IKK activity leads to dysregulated notch-dependent gene expression in colorectal cancer." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(1): 276-81.
- Fernandez, L., S. Rodriguez, et al. (2008). "Tumor necrosis factor-alpha and endothelial cells modulate Notch signaling in the bone marrow microenvironment during inflammation." *Exp Hematol* **36**(5): 545-558.
- Ferran, C. (2006). "Protective genes in the vessel wall: Modulators of graft survival and function." *Transplantation* **82**(1 Suppl): S36-40.
- Ferrara, N., H. P. Gerber, et al. (2003). "The biology of VEGF and its receptors." *Nat Med* **9**(6): 669-76.
- Fitau, J., G. Bouday, et al. (2006). "The adaptor molecule LNK negatively regulates TNFalpha -dependent VCAM-1 expression in endothelial cells through inhibition of the ERK1 and 2 pathways." *J Biol Chem*.
- Florena, A. M., C. Tripodo, et al. (2007). "Associations between Notch-2, Akt-1 and HER2/neu expression in invasive human breast cancer: a tissue microarray immunophenotypic analysis on 98 patients." *Pathobiology* **74**(6): 317-22.
- Florey (1966). "The endothelial cell." *Br Med J* **2**(5512): 487-90.
- Forbes, R. D., S. X. Zheng, et al. (1994). "Evidence that recipient CD8+ T cell depletion does not alter development of chronic vascular rejection in a rat heart allograft model." *Transplantation* **57**(8): 1238-46.
- Fortini, M. E. (2002). "Gamma-secretase-mediated proteolysis in cell-surface-receptor signalling." *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**(9): 673-84.
- Frangianni, N. G. (2006). "Targeting the inflammatory response in healing myocardial infarcts." *Curr Med Chem* **13**(16): 1877-93.
- Frid, M. G., V. A. Kale, et al. (2002). "Mature vascular endothelium can give rise to smooth muscle cells via endothelial-mesenchymal transdifferentiation: in vitro analysis." *Circ Res* **90**(11): 1189-96.
- Fryer, C. J., J. B. White, et al. (2004). "Mastermind recruits CycC:CDK8 to phosphorylate the Notch ICD and coordinate activation with turnover." *Mol Cell* **16**(4): 509-20.
- Fukudome, K., S. Kurosawa, et al. (1996). "The endothelial cell protein C receptor. Cell surface expression and direct ligand binding by the soluble receptor." *J Biol Chem* **271**(29): 17491-8.
- Fung, E., S. M. Tang, et al. (2007). "Delta-like 4 induces notch signaling in macrophages: implications for inflammation." *Circulation* **115**(23): 2948-56.
- Furukawa, Y., G. Becker, et al. (1999). "Interleukin-10 (IL-10) augments allograft arterial disease: paradoxical effects of IL-10 in vivo." *Am J Pathol* **155**(6): 1929-39.
- Gabay, C. and I. Kushner (1999). "Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation." *N Engl J Med* **340**(6): 448-54.
- Gainetdinov, R. R., R. T. Premont, et al. (2004). "Desensitization of G protein-coupled receptors and neuronal functions." *Annu Rev Neurosci* **27**: 107-44.
- Gale, N. W., M. G. Dominguez, et al. (2004). "Haploinsufficiency of delta-like 4 ligand results in embryonic lethality due to major defects in arterial and vascular development." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(45): 15949-54.
- Gao, J., Z. Song, et al. (2008). "Deregulated expression of Notch receptors in human hepatocellular carcinoma." *Dig Liver Dis* **40**(2): 114-21.
- Gao, S. Z., J. S. Schroeder, et al. (1989). "Prevalence of accelerated coronary artery disease in heart transplant survivors. Comparison of cyclosporine and azathioprine regimens." *Circulation* **80**(5 Pt 2): III100-5.
- Gao, W., P. S. Topham, et al. (2000). "Targeting of the chemokine receptor CCR1 suppresses development of acute and chronic cardiac allograft rejection." *J Clin Invest* **105**(1): 35-44.

- Gasser, M., A. M. Waaga, et al. (2000). "The influence of donor brain death on short and long-term outcome of solid organ allografts." *Ann Transplant* **5**(4): 61-7.
- Gewaltig, M. T. and G. Kojda (2002). "Vasoprotection by nitric oxide: mechanisms and therapeutic potential." *Cardiovasc Res* **55**(2): 250-60.
- Glaser, R., M. M. Lu, et al. (2002). "Smooth muscle cells, but not myocytes, of host origin in transplanted human hearts." *Circulation* **106**(1): 17-9.
- Gramantieri, L., C. Giovannini, et al. (2007). "Aberrant Notch3 and Notch4 expression in human hepatocellular carcinoma." *Liver Int* **27**(7): 997-1007.
- Grattan, M. T., C. E. Moreno-Cabral, et al. (1989). "Cytomegalovirus infection is associated with cardiac allograft rejection and atherosclerosis." *JAMA* **261**(24): 3561-6.
- Gray, G. E., R. S. Mann, et al. (1999). "Human ligands of the Notch receptor." *Am J Pathol* **154**(3): 785-94.
- Greenwald, I. (1998). "LIN-12/Notch signaling: lessons from worms and flies." *Genes Dev* **12**(12): 1751-62.
- Gridley, T. (1997). "Notch signaling in vertebrate development and disease." *Mol Cell Neurosci* **9**(2): 103-8.
- Griffith, T. M., A. T. Chaytor, et al. (2004). "Enhanced inhibition of the EDHF phenomenon by a phenyl methoxyalaninyl phosphoramidate derivative of dideoxyadenosine." *Br J Pharmacol* **142**(1): 27-30.
- Grimm, P. C., P. Nickerson, et al. (2001). "Neointimal and tubulointerstitial infiltration by recipient mesenchymal cells in chronic renal-allograft rejection." *N Engl J Med* **345**(2): 93-7.
- Hainaud, P., J. O. Contreres, et al. (2006). "The role of the vascular endothelial growth factor-Delta-like 4 ligand/Notch4-ephrin B2 cascade in tumor vessel remodeling and endothelial cell functions." *Cancer Res* **66**(17): 8501-10.
- Haines, N. and K. D. Irvine (2003). "Glycosylation regulates Notch signalling." *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**(10): 786-97.
- Hancock, W. W., R. Buelow, et al. (1998). "Antibody-induced transplant arteriosclerosis is prevented by graft expression of anti-oxidant and anti-apoptotic genes." *Nat Med* **4**(12): 1392-6.
- Hao, H., G. Gabbiani, et al. (2003). "Arterial smooth muscle cell heterogeneity: implications for atherosclerosis and restenosis development." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **23**(9): 1510-20.
- Hayry, P., H. Isoniemi, et al. (1993). "Chronic allograft rejection." *Immunol Rev* **134**: 33-81.
- Hebert, M. J., S. R. Gullans, et al. (1998). "Apoptosis of endothelial cells is associated with paracrine induction of adhesion molecules: evidence for an interleukin-1beta-dependent paracrine loop." *Am J Pathol* **152**(2): 523-32.
- Heibein, J. A., I. S. Goping, et al. (2000). "Granzyme B-mediated cytochrome c release is regulated by the Bcl-2 family members bid and Bax." *J Exp Med* **192**(10): 1391-402.
- Hellstrom, M., L. K. Phng, et al. (2007). "Dll4 signalling through Notch1 regulates formation of tip cells during angiogenesis." *Nature* **445**(7129): 776-80.
- Heltianu, C., M. Simionescu, et al. (1982). "Histamine receptors of the microvascular endothelium revealed in situ with a histamine-ferritin conjugate: characteristic high-affinity binding sites in venules." *J Cell Biol* **93**(2): 357-64.
- Henrique, D., E. Hirsinger, et al. (1997). "Maintenance of neuroepithelial progenitor cells by Delta-Notch signalling in the embryonic chick retina." *Curr Biol* **7**(9): 661-70.
- Hillebrands, J. L., F. A. Klatter, et al. (2003). "Origin of vascular smooth muscle cells and the role of circulating stem cells in transplant arteriosclerosis." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **23**(3): 380-7.
- Hiratochi, M., H. Nagase, et al. (2007). "The Delta intracellular domain mediates TGF-beta/Activin signaling through binding to Smads and has an important bi-directional function in the Notch-Delta signaling pathway." *Nucleic Acids Res* **35**(3): 912-22.
- Hofmann, J. J. and M. L. Iruela-Arispe (2007). "Notch signaling in blood vessels: who is talking to whom about what?" *Circ Res* **100**(11): 1556-68.
- Hofmann, J. J. and M. Luisa Iruela-Arispe (2007). "Notch expression patterns in the retina: An eye on receptor-ligand distribution during angiogenesis." *Gene Expr Patterns* **7**(4): 461-70.
- Hognestad, A., K. Endresen, et al. (2003). "Plasma C-reactive protein as a marker of cardiac allograft vasculopathy in heart transplant recipients." *J Am Coll Cardiol* **42**(3): 477-82.
- Holschermann, H., R. M. Bohle, et al. (1999). "In situ detection of tissue factor within the coronary intima in rat cardiac allograft vasculopathy." *Am J Pathol* **154**(1): 211-20.
- Hoyne, G. F., I. Le Roux, et al. (2000). "Serrate1-induced notch signalling regulates the decision between immunity and tolerance made by peripheral CD4(+) T cells." *International Immunology* **12**(2): 177-85.
- Hsieh, J. J., S. Zhou, et al. (1999). "CIR, a corepressor linking the DNA binding factor CBF1 to the histone deacetylase complex." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(1): 23-8.
- Hu, Q. D., B. T. Ang, et al. (2003). "F3/contactin acts as a functional ligand for Notch during oligodendrocyte maturation." *Cell* **115**(2): 163-75.

- Huber, J., A. Vales, et al. (2002). "Oxidized membrane vesicles and blebs from apoptotic cells contain biologically active oxidized phospholipids that induce monocyte-endothelial interactions." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **22**(1): 101-7.
- Hubmann, R., J. D. Schwarzmeier, et al. (2002). "Notch2 is involved in the overexpression of CD23 in B-cell chronic lymphocytic leukemia." *Blood* **99**(10): 3742-7.
- Ip, Y. T. and T. Gridley (2002). "Cell movements during gastrulation: snail dependent and independent pathways." *Curr Opin Genet Dev* **12**(4): 423-9.
- Irvin, D. K., S. D. Zurcher, et al. (2001). "Expression patterns of Notch1, Notch2, and Notch3 suggest multiple functional roles for the Notch-DSL signaling system during brain development." *J Comp Neurol* **436**(2): 167-81.
- Iso, T., Y. Hamamori, et al. (2003). "Notch signaling in vascular development." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **23**(4): 543-53.
- Iso, T., L. Kedes, et al. (2003). "HES and HERP families: multiple effectors of the Notch signaling pathway." *J Cell Physiol* **194**(3): 237-55.
- Ito, T., T. Ueno, et al. (2005). "Analysis of the role of negative T cell costimulatory pathways in CD4 and CD8 T cell-mediated alloimmune responses in vivo." *J Immunol* **174**(11): 6648-56.
- Itoh, M., C. H. Kim, et al. (2003). "Mind bomb is a ubiquitin ligase that is essential for efficient activation of Notch signaling by Delta." *Dev Cell* **4**(1): 67-82.
- Iwata, A., S. Sai, et al. (2001). "Liposome-mediated gene transfection of endothelial nitric oxide synthase reduces endothelial activation and leukocyte infiltration in transplanted hearts." *Circulation* **103**(22): 2753-9.
- Jagnandan, D., W. C. Sessa, et al. (2005). "Intracellular location regulates calcium-calmodulin-dependent activation of organelle-restricted eNOS." *Am J Physiol Cell Physiol* **289**(4): C1024-33.
- Jain, R. K. (2003). "Molecular regulation of vessel maturation." *Nat Med* **9**(6): 685-93.
- Jandeleit-Dahm, K. and M. E. Cooper (2008). "The role of AGEs in cardiovascular disease." *Curr Pharm Des* **14**(10): 979-86.
- Jehn, B. M., W. Bielke, et al. (1999). "Cutting edge: protective effects of notch-1 on TCR-induced apoptosis." *J Immunol* **162**(2): 635-8.
- Jenkinson, E. J., W. E. Jenkinson, et al. (2006). "The thymus and T-cell commitment: the right niche for Notch?" *Nat Rev Immunol* **6**(7): 551-5.
- Jones, C. A. and D. Y. Li (2007). "Common cues regulate neural and vascular patterning." *Curr Opin Genet Dev* **17**(4): 332-6.
- Joutel, A., F. Andreux, et al. (2000). "The ectodomain of the Notch3 receptor accumulates within the cerebrovasculature of CADASIL patients." *J Clin Invest* **105**(5): 597-605.
- Joutel, A., C. Corpechot, et al. (1996). "Notch3 mutations in CADASIL, a hereditary adult-onset condition causing stroke and dementia." *Nature* **383**(6602): 707-10.
- Jurcevic, S., M. E. Ainsworth, et al. (2001). "Antivimentin antibodies are an independent predictor of transplant-associated coronary artery disease after cardiac transplantation." *Transplantation* **71**(7): 886-92.
- Kao, H. Y., P. Ordentlich, et al. (1998). "A histone deacetylase corepressor complex regulates the Notch signal transduction pathway." *Genes Dev* **12**(15): 2269-77.
- Kared, H., H. Adle-Biassette, et al. (2006). "Jagged2-expressing hematopoietic progenitors promote regulatory T cell expansion in the periphery through notch signaling." *Immunity* **25**(5): 823-34.
- Karmann, K., W. Min, et al. (1996). "Activation and homologous desensitization of human endothelial cells by CD40 ligand, tumor necrosis factor, and interleukin 1." *J Exp Med* **184**(1): 173-82.
- Karsan, A. (2005). "The role of notch in modeling and maintaining the vasculature." *Can J Physiol Pharmacol* **83**(1): 14-23.
- Karsan, A., E. Yee, et al. (1996). "Cloning of human Bcl-2 homologue: inflammatory cytokines induce human A1 in cultured endothelial cells." *Blood* **87**(8): 3089-96.
- Kennard, S., H. Liu, et al. (2008). "Transforming growth factor-beta (TGF- 1) down-regulates Notch3 in fibroblasts to promote smooth muscle gene expression." *J Biol Chem* **283**(3): 1324-33.
- Kim, J. W., M. J. Kim, et al. (2005). "Notch interferes with the scaffold function of JNK-interacting protein 1 to inhibit the JNK signaling pathway." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(40): 14308-13.
- Kim, M. Y., J. H. Park, et al. (2008). "Downregulation by lipopolysaccharide of Notch signaling, via nitric oxide." *J Cell Sci* **121**(Pt 9): 1466-76.
- Knight, D. A., B. R. Briggs, et al. (2000). "Attenuation of cytomegalovirus-induced endothelial intercellular adhesion molecule-1 mRNA/protein expression and T lymphocyte adhesion by a 2'-O-methoxyethyl antisense oligonucleotide." *Transplantation* **69**(3): 417-26.
- Koskinen, P., K. Lemstrom, et al. (1994). "Acute cytomegalovirus infection induces a subendothelial inflammation (endothelialitis) in the allograft vascular wall. A possible linkage with enhanced allograft arteriosclerosis." *Am J Pathol* **144**(1): 41-50.

- Kourilsky, P., G. Chaouat, et al. (1987). "Working principles in the immune system implied by the "peptidic self" model." *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**(10): 3400-4.
- Krebs, L. T., Y. Xue, et al. (2000). "Notch signaling is essential for vascular morphogenesis in mice." *Genes Dev* **14**(11): 1343-52.
- Krebs, L. T., Y. Xue, et al. (2003). "Characterization of Notch3-deficient mice: normal embryonic development and absence of genetic interactions with a Notch1 mutation." *Genesis* **37**(3): 139-43.
- Kreuz, S., D. Siegmund, et al. (2001). "NF-kappaB inducers upregulate cFLIP, a cycloheximide-sensitive inhibitor of death receptor signaling." *Mol Cell Biol* **21**(12): 3964-73.
- Kubes, P., M. Suzuki, et al. (1991). "Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion." *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(11): 4651-5.
- Labarrere, C. A., J. B. Lee, et al. (2002). "C-reactive protein, arterial endothelial activation, and development of transplant coronary artery disease: a prospective study." *Lancet* **360**(9344): 1462-7.
- Lammert, E., J. Brown, et al. (2000). "Notch gene expression during pancreatic organogenesis." *Mech Dev* **94**(1-2): 199-203.
- Land, W. (1994). "Impact of the reperfusion injury on acute and chronic rejection events following clinical cadaveric renal transplantation." *Clin Investig* **72**(9): 719.
- Langevin, J., R. Le Borgne, et al. (2005). "Lethal giant larvae controls the localization of notch-signaling regulators numb, neuralized, and Sanpodo in Drosophila sensory-organ precursor cells." *Curr Biol* **15**(10): 955-62.
- Lawson, N. D., N. Scheer, et al. (2001). "Notch signaling is required for arterial-venous differentiation during embryonic vascular development." *Development* **128**(19): 3675-83.
- Le Bas-Bernardet, S., M. Hourmant, et al. (2003). "Non-HLA-type endothelial cell reactive alloantibodies in pre-transplant sera of kidney recipients trigger apoptosis." *Am J Transplant* **3**(2): 167-77.
- Lee, P. C., Z. L. Wang, et al. (2000). "Endothelial nitric oxide synthase protects aortic allografts from the development of transplant arteriosclerosis." *Transplantation* **69**(6): 1186-92.
- Lemstrom, K., M. Persoons, et al. (1993). "Cytomegalovirus infection enhances allograft arteriosclerosis in the rat." *Transplant Proc* **25**(1 Pt 2): 1406-7.
- Leong, K. G., X. Hu, et al. (2002). "Activated Notch4 inhibits angiogenesis: role of beta 1-integrin activation." *Mol Cell Biol* **22**(8): 2830-41.
- Leong, K. G., K. Niessen, et al. (2007). "Jagged1-mediated Notch activation induces epithelial-to-mesenchymal transition through Slug-induced repression of E-cadherin." *J Exp Med* **204**(12): 2935-48.
- Ley, K. and J. Reutershan (2006). "Leucocyte-endothelial interactions in health and disease." *Handb Exp Pharmacol*(176 Pt 2): 97-133.
- Li, J. H., M. S. Kluger, et al. (2002). "Interferon-gamma augments CD95(APO-1/Fas) and pro-caspase-8 expression and sensitizes human vascular endothelial cells to CD95-mediated apoptosis." *Am J Pathol* **161**(4): 1485-95.
- Li, J. H. and J. S. Pober (2005). "The cathepsin B death pathway contributes to TNF plus IFN-gamma-mediated human endothelial injury." *J Immunol* **175**(3): 1858-66.
- Li, Y. P., S. Paczesny, et al. (2008). "Human mesenchymal stem cells license adult CD34+ hemopoietic progenitor cells to differentiate into regulatory dendritic cells through activation of the Notch pathway." *J Immunol* **180**(3): 1598-608.
- Li, Z., M. Z. Alavi, et al. (1994). "The proliferation of neointimal smooth muscle cells cultured from rabbit aortic explants 15 weeks after de-endothelialization by a balloon catheter." *Int J Exp Pathol* **75**(3): 169-77.
- Liao, Y. F., B. J. Wang, et al. (2004). "Tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1beta, and interferon-gamma stimulate gamma-secretase-mediated cleavage of amyloid precursor protein through a JNK-dependent MAPK pathway." *J Biol Chem* **279**(47): 49523-32.
- Limbourg, A., M. Ploom, et al. (2007). "Notch ligand Delta-like 1 is essential for postnatal arteriogenesis." *Circ Res* **100**(3): 363-71.
- Limbourg, F. P., K. Takeshita, et al. (2005). "Essential role of endothelial Notch1 in angiogenesis." *Circulation* **111**(14): 1826-32.
- Lin, H., J. E. Wilson, et al. (1994). "Comparable proximal and distal severity of intimal thickening and size of epicardial coronary arteries in transplant arteriopathy of human cardiac allografts." *J Heart Lung Transplant* **13**(5): 824-33.
- Lin, Y., D. J. Weisdorf, et al. (2000). "Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood." *J Clin Invest* **105**(1): 71-7.
- Lindner, V., C. Booth, et al. (2001). "Members of the Jagged/Notch gene families are expressed in injured arteries and regulate cell phenotype via alterations in cell matrix and cell-cell interaction." *Am J Pathol* **159**(3): 875-83.
- Liotta, F., F. Frosali, et al. (2008). "Human immature myeloid dendritic cells trigger a TH2-polarizing program via Jagged-1/Notch interaction." *J Allergy Clin Immunol* **121**(4): 1000-5 e8.

- Lissemore, J. L. and W. T. Starmer (1999). "Phylogenetic analysis of vertebrate and invertebrate Delta/Serrate/LAG-2 (DSL) proteins." *Mol Phylogenet Evol* **11**(2): 308-19.
- Liu, Z. J., T. Shirakawa, et al. (2003). "Regulation of Notch1 and Dll4 by vascular endothelial growth factor in arterial endothelial cells: implications for modulating arteriogenesis and angiogenesis." *Mol Cell Biol* **23**(1): 14-25.
- Liu, Z. J., M. Xiao, et al. (2006). "Inhibition of endothelial cell proliferation by Notch1 signaling is mediated by repressing MAPK and PI3K/Akt pathways and requires MAML1." *FASEB J* **20**(7): 1009-11.
- Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." *Methods* **25**(4): 402-8.
- Logeat, F., C. Bessia, et al. (1998). "The Notch1 receptor is cleaved constitutively by a furin-like convertase." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(14): 8108-12.
- Loirand, G., P. Guerin, et al. (2006). "Rho kinases in cardiovascular physiology and pathophysiology." *Circ Res* **98**(3): 322-34.
- Loomes, K. M., D. B. Taichman, et al. (2002). "Characterization of Notch receptor expression in the developing mammalian heart and liver." *Am J Med Genet* **112**(2): 181-9.
- Lubman, O. Y., S. V. Korolev, et al. (2004). "Anchoring notch genetics and biochemistry; structural analysis of the ankyrin domain sheds light on existing data." *Mol Cell* **13**(5): 619-26.
- Luckhoff, A. and D. E. Clapham (1992). "Inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate activates an endothelial Ca(2+)-permeable channel." *Nature* **355**(6358): 356-8.
- MacKenzie, F., P. Duriez, et al. (2004). "Notch4-induced inhibition of endothelial sprouting requires the ankyrin repeats and involves signaling through RBP-Jkappa." *Blood* **104**(6): 1760-8.
- MacKenzie, F., P. Duriez, et al. (2004). "Notch4 inhibits endothelial apoptosis via RBP-Jkappa-dependent and -independent pathways." *J Biol Chem* **279**(12): 11657-63.
- Madge, L. A. and J. S. Pober (2001). "TNF signaling in vascular endothelial cells." *Exp Mol Pathol* **70**(3): 317-25.
- Madri, J. A., B. M. Pratt, et al. (1988). "Phenotypic modulation of endothelial cells by transforming growth factor-beta depends upon the composition and organization of the extracellular matrix." *J Cell Biol* **106**(4): 1375-84.
- Maekawa, Y., S. Tsukumo, et al. (2003). "Delta1-Notch3 interactions bias the functional differentiation of activated CD4+ T cells." *Immunity* **19**(4): 549-59.
- Mailhos, C., U. Modlich, et al. (2001). "Delta4, an endothelial specific notch ligand expressed at sites of physiological and tumor angiogenesis." *Differentiation* **69**(2-3): 135-44.
- Maillard, I., S. H. Adler, et al. (2003). "Notch and the immune system." *Immunity* **19**(6): 781-91.
- Marelli-Berg, F. M. and S. J. Jarmin (2004). "Antigen presentation by the endothelium: a green light for antigen-specific T cell trafficking?" *Immunol Lett* **93**(2-3): 109-13.
- Martin, M. U. and H. Wesche (2002). "Summary and comparison of the signaling mechanisms of the Toll/interleukin-1 receptor family." *Biochim Biophys Acta* **1592**(3): 265-80.
- Masuda, S., K. Kumano, et al. (2005). "Notch1 oncoprotein antagonizes TGF-beta/Smad-mediated cell growth suppression via sequestration of coactivator p300." *Cancer Sci* **96**(5): 274-82.
- Matsuno, K., D. Eastman, et al. (1998). "Human deltex is a conserved regulator of Notch signalling." *Nat Genet* **19**(1): 74-8.
- McCright, B., X. Gao, et al. (2001). "Defects in development of the kidney, heart and eye vasculature in mice homozygous for a hypomorphic Notch2 mutation." *Development* **128**(4): 491-502.
- McDaniell, R., D. M. Warthen, et al. (2006). "NOTCH2 mutations cause Alagille syndrome, a heterogeneous disorder of the notch signaling pathway." *Am J Hum Genet* **79**(1): 169-73.
- Merrill, J. P., J. E. Murray, et al. (1956). "Successful homotransplantation of the human kidney between identical twins." *J Am Med Assoc* **160**(4): 277-82.
- Micchelli, C. A., W. P. Esler, et al. (2003). "Gamma-secretase/presenilin inhibitors for Alzheimer's disease phenocopy Notch mutations in Drosophila." *Faseb J* **17**(1): 79-81.
- Micheau, O. and J. Tschopp (2003). "Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes." *Cell* **114**(2): 181-90.
- Milner, L. A. and A. Bigas (1999). "Notch as a mediator of cell fate determination in hematopoiesis: evidence and speculation." *Blood* **93**(8): 2431-48.
- Minami, E., M. A. Laflamme, et al. (2005). "Extracardiac progenitor cells repopulate most major cell types in the transplanted human heart." *Circulation* **112**(19): 2951-8.
- Minato, Y. and K. Yasutomo (2005). "Regulation of acquired immune system by notch signaling." *Int J Hematol* **82**(4): 302-6.
- Minshall, R. D. and A. B. Malik (2006). "Transport across the endothelium: regulation of endothelial permeability." *Handb Exp Pharmacol*(176 Pt 1): 107-44.

- Minter, L. M., D. M. Turley, et al. (2005). "Inhibitors of gamma-secretase block in vivo and in vitro T helper type 1 polarization by preventing Notch upregulation of Tbx21." *Nat Immunol* **6**(7): 680-8.
- Mitchell, J. A., S. Larkin, et al. (1995). "Cyclooxygenase-2: regulation and relevance in inflammation." *Biochem Pharmacol* **50**(10): 1535-42.
- Mitchell, R. N. and P. Libby (2007). "Vascular remodeling in transplant vasculopathy." *Circ Res* **100**(7): 967-78.
- Miyamoto, T., Y. Sasaguri, et al. (1997). "Expression of stem cell factor in human aortic endothelial and smooth muscle cells." *Atherosclerosis* **129**(2): 207-13.
- Miyamoto, Y., A. Maitra, et al. (2003). "Notch mediates TGF alpha-induced changes in epithelial differentiation during pancreatic tumorigenesis." *Cancer Cell* **3**(6): 565-76.
- Mohr, O. L. (1919). "Character Changes Caused by Mutation of an Entire Region of a Chromosome in Drosophila." *Genetics* **4**(3): 275-82.
- Moiseeva, E. P. (2001). "Adhesion receptors of vascular smooth muscle cells and their functions." *Cardiovasc Res* **52**(3): 372-86.
- Mollison, K. W., T. A. Fey, et al. (1998). "Nephrotoxicity studies of the immunosuppressants tacrolimus (FK506) and ascomycin in rat models." *Toxicology* **125**(2-3): 169-81.
- Moloney, D. J., V. M. Panin, et al. (2000). "Fringe is a glycosyltransferase that modifies Notch." *Nature* **406**(6794): 369-75.
- Monaco, C., E. Andreaskos, et al. (2004). "T-cell-mediated signalling in immune, inflammatory and angiogenic processes: the cascade of events leading to inflammatory diseases." *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* **3**(1): 35-42.
- Morimura, T., R. Goitsuka, et al. (2000). "Cell cycle arrest and apoptosis induced by Notch1 in B cells." *J Biol Chem* **275**(47): 36523-31.
- Mumm, J. S., E. H. Schroeter, et al. (2000). "A ligand-induced extracellular cleavage regulates gamma-secretase-like proteolytic activation of Notch1." *Mol Cell* **5**(2): 197-206.
- Mungamuri, S. K., X. Yang, et al. (2006). "Survival signaling by Notch1: mammalian target of rapamycin (mTOR)-dependent inhibition of p53." *Cancer Res* **66**(9): 4715-24.
- Munro, J. M., J. S. Pober, et al. (1989). "Tumor necrosis factor and interferon-gamma induce distinct patterns of endothelial activation and associated leukocyte accumulation in skin of Papio anubis." *Am J Pathol* **135**(1): 121-33.
- Murata-Ohsawa, M., S. Tohda, et al. (2005). "The Notch ligand, Delta-1, alters retinoic acid (RA)-induced neutrophilic differentiation into monocytic and reduces RA-induced apoptosis in NB4 cells." *Leuk Res* **29**(2): 197-203.
- Nagano, H., P. Libby, et al. (1998). "Coronary arteriosclerosis after T-cell-mediated injury in transplanted mouse hearts: role of interferon-gamma." *Am J Pathol* **152**(5): 1187-97.
- Nagano, H., R. N. Mitchell, et al. (1997). "Interferon-gamma deficiency prevents coronary arteriosclerosis but not myocardial rejection in transplanted mouse hearts." *J Clin Invest* **100**(3): 550-7.
- Nagata, S. (1999). "Fas ligand-induced apoptosis." *Annu Rev Genet* **33**: 29-55.
- Nakazawa, M., H. Ishii, et al. (2001). "NFkappaB2 (p52) promoter activation via Notch signaling pathway in rheumatoid synoviocytes." *Int J Mol Med* **7**(1): 31-5.
- Nefedova, Y., P. Cheng, et al. (2004). "Involvement of Notch-1 signaling in bone marrow stroma-mediated de novo drug resistance of myeloma and other malignant lymphoid cell lines." *Blood* **103**(9): 3503-10.
- Nefedova, Y., D. M. Sullivan, et al. (2008). "Inhibition of Notch signaling induces apoptosis of myeloma cells and enhances sensitivity to chemotherapy." *Blood* **111**(4): 2220-9.
- Neves, A. and J. R. Priess (2005). "The REF-1 family of bHLH transcription factors pattern C. elegans embryos through Notch-dependent and Notch-independent pathways." *Dev Cell* **8**(6): 867-79.
- Nickoloff, B. J., B. A. Osborne, et al. (2003). "Notch signaling as a therapeutic target in cancer: a new approach to the development of cell fate modifying agents." *Oncogene* **22**(42): 6598-608.
- Nicolas, M., A. Wolfer, et al. (2003). "Notch1 functions as a tumor suppressor in mouse skin." *Nat Genet* **33**(3): 416-21.
- Nieminen, M., T. Henttinen, et al. (2006). "Vimentin function in lymphocyte adhesion and transcellular migration." *Nat Cell Biol* **8**(2): 156-62.
- Nieto, M. A. (2002). "The snail superfamily of zinc-finger transcription factors." *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**(3): 155-66.
- Niu, J., J. Profirovic, et al. (2003). "G Protein betagamma subunits stimulate p114RhoGEF, a guanine nucleotide exchange factor for RhoA and Rac1: regulation of cell shape and reactive oxygen species production." *Circ Res* **93**(9): 848-56.
- Nofziger, D., A. Miyamoto, et al. (1999). "Notch signaling imposes two distinct blocks in the differentiation of C2C12 myoblasts." *Development* **126**(8): 1689-702.
- Noguera-Troise, I., C. Daly, et al. (2006). "Blockade of Dll4 inhibits tumour growth by promoting non-productive angiogenesis." *Nature* **444**(7122): 1032-7.

- Nosedá, M., L. Chang, et al. (2004). "Notch activation induces endothelial cell cycle arrest and participates in contact inhibition: role of p21Cip1 repression." *Mol Cell Biol* **24**(20): 8813-22.
- Nosedá, M., G. McLean, et al. (2004). "Notch activation results in phenotypic and functional changes consistent with endothelial-to-mesenchymal transformation." *Circ Res* **94**(7): 910-7.
- Nosedá, M., G. McLean, et al. (2004). "Notch Activation Results in Phenotypic and Functional Changes Consistent With Endothelial-to-Mesenchymal Transformation." *Circ Res*.
- Nosedá, M., K. Niessen, et al. (2005). "Notch-dependent cell cycle arrest is associated with downregulation of minichromosome maintenance proteins." *Circ Res* **97**(2): 102-4.
- O'Connor, D. S., J. S. Schechner, et al. (2000). "Control of apoptosis during angiogenesis by survivin expression in endothelial cells." *Am J Pathol* **156**(2): 393-8.
- O'Neill, C. F., S. Urs, et al. (2007). "Notch2 signaling induces apoptosis and inhibits human MDA-MB-231 xenograft growth." *Am J Pathol* **171**(3): 1023-36.
- Oakley, F., J. Mann, et al. (2003). "Basal expression of IkappaBalpha is controlled by the mammalian transcriptional repressor RBP-J (CBF1) and its activator Notch1." *J Biol Chem* **278**(27): 24359-70.
- Ohishi, K., N. Katayama, et al. (2003). "Notch signalling in hematopoiesis." *Semin Cell Dev Biol* **14**(2): 143-50.
- Ohishi, K., B. Varnum-Finney, et al. (2001). "The Notch ligand, Delta-1, inhibits the differentiation of monocytes into macrophages but permits their differentiation into dendritic cells." *Blood* **98**(5): 1402-7.
- Oka, C., T. Nakano, et al. (1995). "Disruption of the mouse RBP-J kappa gene results in early embryonic death." *Development* **121**(10): 3291-301.
- Ono, Y., H. Sensui, et al. (2007). "Notch2 negatively regulates myofibroblastic differentiation of myoblasts." *J Cell Physiol* **210**(2): 358-69.
- Ordentlich, P., A. Lin, et al. (1998). "Notch inhibition of E47 supports the existence of a novel signaling pathway." *Mol Cell Biol* **18**(4): 2230-9.
- Osborne, B. A. and L. M. Minter (2007). "Notch signalling during peripheral T-cell activation and differentiation." *Nat Rev Immunol* **7**(1): 64-75.
- Ostroukhova, M., Z. Qi, et al. (2006). "Treg-mediated immunosuppression involves activation of the Notch-HES1 axis by membrane-bound TGF-beta." *J Clin Invest* **116**(4): 996-1004.
- Oswald, F., M. Winkler, et al. (2005). "RBP-Jkappa/SHARP recruits CtIP/CtBP corepressors to silence Notch target genes." *Mol Cell Biol* **25**(23): 10379-90.
- Overstreet, E., E. Fitch, et al. (2004). "Fat facets and Liquid facets promote Delta endocytosis and Delta signaling in the signaling cells." *Development* **131**(21): 5355-66.
- Owens, G. K. (1995). "Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells." *Physiol Rev* **75**(3): 487-517.
- Palmer, R. M., A. G. Ferrige, et al. (1987). "Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor." *Nature* **327**(6122): 524-6.
- Pan, D. and G. M. Rubin (1997). "Kuzbanian controls proteolytic processing of Notch and mediates lateral inhibition during Drosophila and vertebrate neurogenesis." *Cell* **90**(2): 271-80.
- Pan, Y., Z. Liu, et al. (2005). "Notch1 and 2 cooperate in limb ectoderm to receive an early Jagged2 signal regulating interdigital apoptosis." *Dev Biol* **286**(2): 472-82.
- Parks, A. L., K. M. Klueg, et al. (2000). "Ligand endocytosis drives receptor dissociation and activation in the Notch pathway." *Development* **127**(7): 1373-85.
- Parr, C., G. Watkins, et al. (2004). "The possible correlation of Notch-1 and Notch-2 with clinical outcome and tumour clinicopathological parameters in human breast cancer." *Int J Mol Med* **14**(5): 779-86.
- Pasceri, V., J. T. Willerson, et al. (2000). "Direct proinflammatory effect of C-reactive protein on human endothelial cells." *Circulation* **102**(18): 2165-8.
- Pear, W. S. and F. Radtke (2003). "Notch signaling in lymphopoiesis." *Semin Immunol* **15**(2): 69-79.
- Pennington, D. J., B. Silva-Santos, et al. (2005). "Gammadelta T cell development--having the strength to get there." *Curr Opin Immunol* **17**(2): 108-15.
- Pethig, K., B. Heublein, et al. (2000). "Systemic inflammatory response in cardiac allograft vasculopathy: high-sensitive C-reactive protein is associated with progressive luminal obstruction." *Circulation* **102**(19 Suppl 3): III233-6.
- Planat-Benard, V., J. S. Silvestre, et al. (2004). "Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives." *Circulation* **109**(5): 656-63.
- Pober, J. S. (2002). "Endothelial activation: intracellular signaling pathways." *Arthritis Res* **4** Suppl 3: S109-16.
- Pober, J. S. (2007). *The Endothelium: A Comprehensive Reference*. W. C. Aird, Cambridge University Press.
- Pober, J. S. and R. S. Cotran (1990). "The role of endothelial cells in inflammation." *Transplantation* **50**(4): 537-44.
- Pober, J. S. and W. C. Sessa (2007). "Evolving functions of endothelial cells in inflammation." *Nat Rev Immunol* **7**(10): 803-15.

- Prescott, S. M., G. A. Zimmerman, et al. (1984). "Human endothelial cells in culture produce platelet-activating factor (1-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine) when stimulated with thrombin." *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**(11): 3534-8.
- Purow, B. W., R. M. Haque, et al. (2005). "Expression of Notch-1 and its ligands, Delta-like-1 and Jagged-1, is critical for glioma cell survival and proliferation." *Cancer Res* **65**(6): 2353-63.
- Qi, H., M. D. Rand, et al. (1999). "Processing of the notch ligand delta by the metalloprotease Kuzbanian." *Science* **283**(5398): 91-4.
- Quaini, F., K. Urbanek, et al. (2002). "Chimerism of the transplanted heart." *N Engl J Med* **346**(1): 5-15.
- Ramain, P., K. Khechumian, et al. (2001). "Novel Notch alleles reveal a Deltex-dependent pathway repressing neural fate." *Curr Biol* **11**(22): 1729-38.
- Rangarajan, A., C. Talora, et al. (2001). "Notch signaling is a direct determinant of keratinocyte growth arrest and entry into differentiation." *EMBO J* **20**(13): 3427-36.
- Reed, E. F., B. Hong, et al. (1996). "Monitoring of soluble HLA alloantigens and anti-HLA antibodies identifies heart allograft recipients at risk of transplant-associated coronary artery disease." *Transplantation* **61**(4): 566-72.
- Ridgway, J., G. Zhang, et al. (2006). "Inhibition of Dll4 signalling inhibits tumour growth by deregulating angiogenesis." *Nature* **444**(7122): 1083-7.
- Romagnoli, M., V. Trichet, et al. (2007). "Significant impact of survivin on myeloma cell growth." *Leukemia* **21**(5): 1070-8.
- Romer, S., U. Saunders, et al. (2003). "Notch1 enhances B-cell receptor-induced apoptosis in mature activated B cells without affecting cell cycle progression and surface IgM expression." *Cell Death Differ* **10**(7): 833-44.
- Rondaj, M. G., R. Bierings, et al. (2006). "Dynamics and plasticity of Weibel-Palade bodies in endothelial cells." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **26**(5): 1002-7.
- Ross, R. (1993). "The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s." *Nature* **362**(6423): 801-9.
- Ruchoux, M. M. and C. A. Maurage (1997). "CADASIL: Cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy." *J Neuropathol Exp Neurol* **56**(9): 947-64.
- Rusconi, J. C. and V. Corbin (1998). "Evidence for a novel Notch pathway required for muscle precursor selection in Drosophila." *Mech Dev* **79**(1-2): 39-50.
- Russell, P. S., C. M. Chase, et al. (1994). "Coronary atherosclerosis in transplanted mouse hearts. III. Effects of recipient treatment with a monoclonal antibody to interferon-gamma." *Transplantation* **57**(9): 1367-71.
- Rutz, S., B. Mordmuller, et al. (2005). "Notch ligands Delta-like1, Delta-like4 and Jagged1 differentially regulate activation of peripheral T helper cells." *Eur J Immunol* **35**(8): 2443-51.
- Sade, H., S. Krishna, et al. (2004). "The anti-apoptotic effect of Notch-1 requires p56lck-dependent, Akt/PKB-mediated signaling in T cells." *J Biol Chem* **279**(4): 2937-44.
- Saito, T., S. Chiba, et al. (2003). "Notch2 is preferentially expressed in mature B cells and indispensable for marginal zone B lineage development." *Immunity* **18**(5): 675-85.
- Sales, V. L., G. C. Engelmayer, Jr., et al. (2006). "Transforming growth factor-beta1 modulates extracellular matrix production, proliferation, and apoptosis of endothelial progenitor cells in tissue-engineering scaffolds." *Circulation* **114**(1 Suppl): I193-9.
- Samon, J. B., A. Champhekar, et al. (2008). "Notch1 and TGF{beta}1 cooperatively regulate Foxp3 expression and the maintenance of peripheral regulatory T cells." *Blood*.
- Santagata, S., F. Demichelis, et al. (2004). "JAGGED1 expression is associated with prostate cancer metastasis and recurrence." *Cancer Res* **64**(19): 6854-7.
- Sarmiento, L. M., H. Huang, et al. (2005). "Notch1 modulates timing of G1-S progression by inducing SKP2 transcription and p27 Kip1 degradation." *J Exp Med* **202**(1): 157-68.
- Savagner, P. (2001). "Leaving the neighborhood: molecular mechanisms involved during epithelial-mesenchymal transition." *Bioessays* **23**(10): 912-23.
- Scehnet, J. S., W. Jiang, et al. (2007). "Inhibition of Dll4-mediated signaling induces proliferation of immature vessels and results in poor tissue perfusion." *Blood* **109**(11): 4753-60.
- Schenkel, A. R., Z. Mamdouh, et al. (2002). "CD99 plays a major role in the migration of monocytes through endothelial junctions." *Nat Immunol* **3**(2): 143-50.
- Schnickel, G. T., D. Whiting, et al. (2004). "CD8 lymphocytes are sufficient for the development of chronic rejection." *Transplantation* **78**(11): 1634-9.
- Semenza, G. L. (2007). "Vasculogenesis, angiogenesis, and arteriogenesis: mechanisms of blood vessel formation and remodeling." *J Cell Biochem* **102**(4): 840-7.
- Shawber, C., D. Nofziger, et al. (1996). "Notch signaling inhibits muscle cell differentiation through a CBF1-independent pathway." *Development* **122**(12): 3765-73.
- Shawber, C. J., Y. Funahashi, et al. (2007). "Notch alters VEGF responsiveness in human and murine endothelial cells by direct regulation of VEGFR-3 expression." *J Clin Invest* **117**(11): 3369-82.

- Shears, L. L., N. Kawaharada, et al. (1997). "Inducible nitric oxide synthase suppresses the development of allograft arteriosclerosis." *J Clin Invest* **100**(8): 2035-42.
- Sherwood, D. R. and D. R. McClay (1997). "Identification and localization of a sea urchin Notch homologue: insights into vegetal plate regionalization and Notch receptor regulation." *Development* **124**(17): 3363-74.
- Shi, S. and P. Stanley (2003). "Protein O-fucosyltransferase 1 is an essential component of Notch signaling pathways." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(9): 5234-9.
- Shiao, S. L., J. M. McNiff, et al. (2005). "Memory T cells and their costimulators in human allograft injury." *J Immunol* **175**(8): 4886-96.
- Shimizu, A., K. Yamada, et al. (2002). "Mechanisms of chronic renal allograft rejection. II. Progressive allograft glomerulopathy in miniature swine." *Lab Invest* **82**(6): 673-86.
- Shimizu, A., K. Yamada, et al. (2002). "Persistent rejection of peritubular capillaries and tubules is associated with progressive interstitial fibrosis." *Kidney Int* **61**(5): 1867-79.
- Shimizu, K., S. Chiba, et al. (2002). "Functional diversity among Notch1, Notch2, and Notch3 receptors." *Biochem Biophys Res Commun* **291**(4): 775-9.
- Shimizu, K., S. Sugiyama, et al. (2001). "Host bone-marrow cells are a source of donor intimal smooth-muscle-like cells in murine aortic transplant arteriopathy." *Nat Med* **7**(6): 738-41.
- Shirali, G. S., J. Ni, et al. (2001). "Association of viral genome with graft loss in children after cardiac transplantation." *N Engl J Med* **344**(20): 1498-503.
- Shou, J., S. Ross, et al. (2001). "Dynamics of notch expression during murine prostate development and tumorigenesis." *Cancer Res* **61**(19): 7291-7.
- Six, E., D. Ndiaye, et al. (2003). "The Notch ligand Delta1 is sequentially cleaved by an ADAM protease and gamma-secretase." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(13): 7638-43.
- Sohn, R. H., C. B. Deming, et al. (2005). "Regulation of endothelial thrombomodulin expression by inflammatory cytokines is mediated by activation of nuclear factor-kappa B." *Blood* **105**(10): 3910-7.
- Soler, M. J., O. M. Martinez-Estrada, et al. (2005). "Circulating endothelial progenitor cells after kidney transplantation." *Am J Transplant* **5**(9): 2154-9.
- Sriuranpong, V., M. W. Borges, et al. (2001). "Notch signaling induces cell cycle arrest in small cell lung cancer cells." *Cancer Res* **61**(7): 3200-5.
- Stary, H. C., D. H. Blankenhorn, et al. (1992). "A definition of the intima of human arteries and of its atherosclerosis-prone regions. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association." *Circulation* **85**(1): 391-405.
- Starzl, T. E., C. G. Groth, et al. (1968). "Orthotopic homotransplantation of the human liver." *Ann Surg* **168**(3): 392-415.
- Stevens, T., J. G. Garcia, et al. (2000). "Mechanisms regulating endothelial cell barrier function." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **279**(3): L419-22.
- Stoica, S. C., F. Cafferty, et al. (2006). "The cumulative effect of acute rejection on development of cardiac allograft vasculopathy." *J Heart Lung Transplant* **25**(4): 420-5.
- Subbotin, V., H. Sun, et al. (1999). "Marked mitigation of transplant vascular sclerosis in FasLgld (CD95L) mutant recipients. The role of alloantibodies in the development of chronic rejection." *Transplantation* **67**(10): 1295-300.
- Suchting, S., C. Freitas, et al. (2007). "The Notch ligand Delta-like 4 negatively regulates endothelial tip cell formation and vessel branching." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(9): 3225-30.
- Sun, J., C. J. Krawczyk, et al. (2008). "Suppression of Th2 cell development by Notch ligands Delta1 and Delta4." *J Immunol* **180**(3): 1655-61.
- Sun, Y., W. Lowther, et al. (2005). "Notch4 intracellular domain binding to Smad3 and inhibition of the TGF-beta signaling." *Oncogene* **24**(34): 5365-74.
- Suzuki, J., S. E. Cole, et al. (2003). "Tumor necrosis factor receptor -1 and -2 double deficiency reduces graft arterial disease in murine cardiac allografts." *Am J Transplant* **3**(8): 968-76.
- Sweeney, C., D. Morrow, et al. (2004). "Notch 1 and 3 receptor signaling modulates vascular smooth muscle cell growth, apoptosis, and migration via a CBF-1/RBP-Jk dependent pathway." *FASEB J* **18**(12): 1421-3.
- Takeshita, K., M. Satoh, et al. (2007). "Critical role of endothelial Notch1 signaling in postnatal angiogenesis." *Circ Res* **100**(1): 70-8.
- Talora, C., A. F. Campese, et al. (2003). "Pre-TCR-triggered ERK signalling-dependent downregulation of E2A activity in Notch3-induced T-cell lymphoma." *EMBO Rep* **4**(11): 1067-72.
- Talora, C., D. C. Sgroi, et al. (2002). "Specific down-modulation of Notch1 signaling in cervical cancer cells is required for sustained HPV-E6/E7 expression and late steps of malignant transformation." *Genes Dev* **16**(17): 2252-63.
- Tanigaki, K., K. Kuroda, et al. (2003). "Regulation of B cell development by Notch/RBP-J signaling." *Semin Immunol* **15**(2): 113-9.

- Taniyama, Y. and K. K. Griendling (2003). "Reactive oxygen species in the vasculature: molecular and cellular mechanisms." *Hypertension* **42**(6): 1075-81.
- Taylor, K. L., A. M. Henderson, et al. (2002). "Notch activation during endothelial cell network formation in vitro targets the basic HLH transcription factor HESR-1 and downregulates VEGFR-2/KDR expression." *Microvasc Res* **64**(3): 372-83.
- Tellides, G., D. A. Tereb, et al. (2000). "Interferon-gamma elicits arteriosclerosis in the absence of leukocytes." *Nature* **403**(6766): 207-11.
- Thaunat, O., A. C. Field, et al. (2005). "Lymphoid neogenesis in chronic rejection: evidence for a local humoral alloimmune response." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(41): 14723-8.
- Thelu, J., P. Rossio, et al. (2002). "Notch signalling is linked to epidermal cell differentiation level in basal cell carcinoma, psoriasis and wound healing." *BMC Dermatol* **2**: 7.
- Timmerman, L. A., J. Grego-Bessa, et al. (2004). "Notch promotes epithelial-mesenchymal transition during cardiac development and oncogenic transformation." *Genes Dev* **18**(1): 99-115.
- Trindade, A., S. R. Kumar, et al. (2008). "Overexpression of Delta-like 4 induces arterialization and attenuates vessel formation in developing mouse embryos." *Blood*.
- Tsai, S., J. Fero, et al. (2000). "Mouse Jagged2 is differentially expressed in hematopoietic progenitors and endothelial cells and promotes the survival and proliferation of hematopoietic progenitors by direct cell-to-cell contact." *Blood* **96**(3): 950-7.
- Uyttendaele, H., J. Ho, et al. (2001). "Vascular patterning defects associated with expression of activated Notch4 in embryonic endothelium." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(10): 5643-8.
- Valantine, H., P. Rickenbacker, et al. (2001). "Metabolic abnormalities characteristic of dysmetabolic syndrome predict the development of transplant coronary artery disease: a prospective study." *Circulation* **103**(17): 2144-52.
- Valantine, H. A. (1999). "Role of CMV in transplant coronary artery disease and survival after heart transplantation." *Transpl Infect Dis* **1 Suppl 1**: 25-30.
- Valantine, H. A. (2003). "Cardiac allograft vasculopathy: central role of endothelial injury leading to transplant "atheroma"." *Transplantation* **76**(6): 891-9.
- Valantine, H. A. (2004). "The role of viruses in cardiac allograft vasculopathy." *Am J Transplant* **4**(2): 169-77.
- Vallance, P., J. Collier, et al. (1989). "Effects of endothelium-derived nitric oxide on peripheral arteriolar tone in man." *Lancet* **2**(8670): 997-1000.
- Vasilescu, E. R., E. K. Ho, et al. (2004). "Anti-HLA antibodies in heart transplantation." *Transpl Immunol* **12**(2): 177-83.
- Vejlstrup, N. G., C. B. Andersen, et al. (2002). "Temporal changes in myocardial endothelial nitric oxide synthase expression following human heart transplantation." *J Heart Lung Transplant* **21**(2): 211-6.
- Venugopal, S. K., S. Devaraj, et al. (2002). "Demonstration that C-reactive protein decreases eNOS expression and bioactivity in human aortic endothelial cells." *Circulation* **106**(12): 1439-41.
- Villa, N., L. Walker, et al. (2001). "Vascular expression of Notch pathway receptors and ligands is restricted to arterial vessels." *Mech Dev* **108**(1-2): 161-4.
- von der Leyen, H. E., G. H. Gibbons, et al. (1995). "Gene therapy inhibiting neointimal vascular lesion: in vivo transfer of endothelial cell nitric oxide synthase gene." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(4): 1137-41.
- Vorontchikhina, M. A., R. C. Zimmermann, et al. (2005). "Unique patterns of Notch1, Notch4 and Jagged1 expression in ovarian vessels during folliculogenesis and corpus luteum formation." *Gene Expr Patterns* **5**(5): 701-9.
- Wakui, M., K. Nakano, et al. (2007). "Notch ligand mRNA levels of human APCs predict Th1/Th2-promoting activities." *Biochem Biophys Res Commun* **358**(2): 596-601.
- Wang, C. H., S. H. Li, et al. (2003). "C-reactive protein upregulates angiotensin type 1 receptors in vascular smooth muscle." *Circulation* **107**(13): 1783-90.
- Wang, G. J., X. X. Sui, et al. (2005). "Regulation of vein graft hyperplasia by survivin, an inhibitor of apoptosis protein." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **25**(10): 2081-7.
- Wang, J., L. Shelly, et al. (2001). "Human Notch-1 inhibits NF-kappa B activity in the nucleus through a direct interaction involving a novel domain." *J Immunol* **167**(1): 289-95.
- Wang, T., C. Dong, et al. (2002). "Overexpression of soluble fas attenuates transplant arteriosclerosis in rat aortic allografts." *Circulation* **106**(12): 1536-42.
- Wang, W., C. Z. Prince, et al. (2002). "Notch3 signaling in vascular smooth muscle cells induces c-FLIP expression via ERK/MAPK activation. Resistance to Fas ligand-induced apoptosis." *J Biol Chem* **277**(24): 21723-9.
- Wang, W. and G. Struhl (2004). "Drosophila Epsin mediates a select endocytic pathway that DSL ligands must enter to activate Notch." *Development* **131**(21): 5367-80.
- Weiber, A. (1964). "Studies of the Vascularization of Healing Wounds with Radioisotopes." *Bull Soc Int Chir* **23**: 171-82.

- Weijzen, S., M. P. Velders, et al. (2002). "The Notch ligand Jagged-1 is able to induce maturation of monocyte-derived human dendritic cells." *J Immunol* **169**(8): 4273-8.
- Weinmaster, G., V. J. Roberts, et al. (1992). "Notch2: a second mammalian Notch gene." *Development* **116**(4): 931-41.
- Weinstein, B. M. and N. D. Lawson (2002). "Arteries, veins, Notch, and VEGF." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **67**: 155-62.
- Weng, A. P., A. A. Ferrando, et al. (2004). "Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia." *Science* **306**(5694): 269-71.
- Wessels, A. and R. Markwald (2000). "Cardiac morphogenesis and dysmorphogenesis. I. Normal development." *Methods Mol Biol* **136**: 239-59.
- Williams, C. K., J. L. Li, et al. (2006). "Up-regulation of the Notch ligand Delta-like 4 inhibits VEGF-induced endothelial cell function." *Blood* **107**(3): 931-9.
- Williams, G. M., D. M. Hume, et al. (1968). "Hyperacute" renal-homograft rejection in man." *N Engl J Med* **279**(12): 611-8.
- Winsauer, G. and R. de Martin (2007). "Resolution of inflammation: intracellular feedback loops in the endothelium." *Thromb Haemost* **97**(3): 364-9.
- Wong, K. K., M. J. Carpenter, et al. (2003). "Notch ligation by Delta1 inhibits peripheral immune responses to transplantation antigens by a CD8+ cell-dependent mechanism." *The Journal of Clinical Investigation* **112**(11): 1741-50.
- Woywodt, A., M. Schroeder, et al. (2003). "Circulating endothelial cells are a novel marker of cyclosporine-induced endothelial damage." *Hypertension* **41**(3 Pt 2): 720-3.
- Wu, G., S. Lyapina, et al. (2001). "SEL-10 is an inhibitor of notch signaling that targets notch for ubiquitin-mediated protein degradation." *Mol Cell Biol* **21**(21): 7403-15.
- Wu, G. D., Y. S. Jin, et al. (2002). "Vascular endothelial cell apoptosis induced by anti-donor non-MHC antibodies: a possible injury pathway contributing to chronic allograft rejection." *J Heart Lung Transplant* **21**(11): 1174-87.
- Wu, L., I. Maillard, et al. (2007). "The transcriptional coactivator Maml1 is required for Notch2-mediated marginal zone B-cell development." *Blood* **110**(10): 3618-23.
- Wu, T. C., R. H. Hruban, et al. (1992). "Demonstration of cytomegalovirus nucleic acids in the coronary arteries of transplanted hearts." *Am J Pathol* **140**(3): 739-47.
- Wunsch, A. M., C. D. Little, et al. (1994). "Cardiac endothelial heterogeneity defines valvular development as demonstrated by the diverse expression of JB3, an antigen of the endocardial cushion tissue." *Dev Biol* **165**(2): 585-601.
- Wurmser, A. E., K. Nakashima, et al. (2004). "Cell fusion-independent differentiation of neural stem cells to the endothelial lineage." *Nature* **430**(6997): 350-6.
- Xue, Y., X. Gao, et al. (1999). "Embryonic lethality and vascular defects in mice lacking the Notch ligand Jagged1." *Hum Mol Genet* **8**(5): 723-30.
- Yamamoto, N., S. Yamamoto, et al. (2001). "Role of Deltex-1 as a transcriptional regulator downstream of the Notch receptor." *J Biol Chem* **276**(48): 45031-40.
- Yen, M. H., G. Pilkington, et al. (2002). "Increased tissue factor expression predicts development of cardiac allograft vasculopathy." *Circulation* **106**(11): 1379-83.
- Yoon, K. and N. Gaiano (2005). "Notch signaling in the mammalian central nervous system: insights from mouse mutants." *Nat Neurosci* **8**(6): 709-15.
- Yoshizumi, M., M. A. Perrella, et al. (1993). "Tumor necrosis factor downregulates an endothelial nitric oxide synthase mRNA by shortening its half-life." *Circ Res* **73**(1): 205-9.
- Yuan, Z. R., N. Kobayashi, et al. (2006). "Human Jagged 1 mutants cause liver defect in Alagille syndrome by overexpression of hepatocyte growth factor." *J Mol Biol* **356**(3): 559-68.
- Yvon, E. S., S. Vigouroux, et al. (2003). "Overexpression of the Notch ligand, Jagged-1, induces alloantigen-specific human regulatory T cells." *Blood* **102**(10): 3815-21.
- Zagouras, P., S. Stifani, et al. (1995). "Alterations in Notch signaling in neoplastic lesions of the human cervix." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(14): 6414-8.
- Zavoico, G. B., B. M. Ewenstein, et al. (1989). "IL-1 and related cytokines enhance thrombin-stimulated PGI2 production in cultured endothelial cells without affecting thrombin-stimulated von Willebrand factor secretion or platelet-activating factor biosynthesis." *J Immunol* **142**(11): 3993-9.
- Zecchini, V., K. Brennan, et al. (1999). "An activity of Notch regulates JNK signalling and affects dorsal closure in Drosophila." *Curr Biol* **9**(9): 460-9.
- Zhai, Y., L. Meng, et al. (2002). "Allograft rejection by primed/memory CD8+ T cells is CD154 blockade resistant: therapeutic implications for sensitized transplant recipients." *J Immunol* **169**(8): 4667-73.
- Zhou, S., M. Fujimuro, et al. (2000). "SKIP, a CBF1-associated protein, interacts with the ankyrin repeat domain of NotchIC To facilitate NotchIC function." *Mol Cell Biol* **20**(7): 2400-10.

- Zweidler-McKay, P. A., Y. He, et al. (2005). "Notch signaling is a potent inducer of growth arrest and apoptosis in a wide range of B-cell malignancies." Blood **106**(12): 3898-906.
- Zwerts, F., F. Lupu, et al. (2007). "Lack of endothelial cell survivin causes embryonic defects in angiogenesis, cardiogenesis, and neural tube closure." Blood **109**(11): 4742-52.

Annexes

Liste des publications

Publications

Quillard T; Coupel S; Coulon F; Romagnoli M; Fitau J; Chatelais M; Barille-Nion S; Charreau B
Notch2 induces Apoptosis of Endothelial Cells by repressing Survivin expression
(Soumis à *Circulation Research*)

Quillard T; Coupel S; Coulon F; Fitau J; Chatelais M; Cuturi MC; Chiffolleau E and Charreau B
Impaired Notch4 activity elicits EC activation and apoptosis: implication for Transplant Arteriosclerosis
(accepté dans *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*)

David Chiron¹, Catherine Pellat-Deceunynck¹, Martine Amiot¹, **Thibaut Quillard**², Béatrice Charreau², Régis Bataille¹, and Gaëtan Jégo¹
TLR3 activation induces various fates of Multiple Myeloma cells
(soumis à *Cancer Research*)

Ashton-Chess J, Giral M, Mengel M, Renaudin K, Foucher Y, Gwinner W, Braud C, Dugast E, **Quillard T**, Thebault P, Chiffolleau E, Braudeau C, Charreau B, Souillou JP, Brouard S
Tribbles-1 as a Novel Biomarker of Chronic Antibody-Mediated Rejection
J Am Soc Nephrol. 2008 Mar 27. [Epub ahead of print]

Fitau J, Boulday G, Coulon F, **Quillard T**, Charreau B.
The adaptor molecule Lnk negatively regulates tumor necrosis factor-alpha-dependent VCAM-1 expression in endothelial cells through inhibition of the ERK1 and -2 pathways

Communications

Orales Inhibition of Notch4 Expression and Notch Activity in EC Promotes Apoptosis and Correlates with Transplant Arteriosclerosis

Quillard, T, Coupel, S, Coulon, F, Fitau, J, Cuturi, MC, Chiffolleau, E and Charreau, B
International Vascular Biology Meeting, Sydney, Australia, 2008

Posters Altered Notch4 signaling by Chronic Rejection mediators in Endothelial Cells of hearts allografts: Potential implications in chronic vascular remodeling processes

Thibaut Quillard, Stéphanie Coupel, Flora Coulon, Juliette Fitau, , Maria-Cristina Cuturi, Elise Chiffolleau and Béatrice Charreau
American Transplant Congress, Toronto, Canada, 2008

Evidence for Differential expression of Notch receptors, their Ligands and Effectors in Human Vascular Endothelial Cells upon Activation

Thibaut Quillard, Stéphanie Coupel, Flora Coulon, Juliette Fitau and Béatrice Charreau
American Transplant Congress, San Francisco, USA, 2007 (Poster of Distinction)

Regulations of Notch2, 3, 4 and Dll1 expression by TNF α in Endothelial Cells are specifically dependant on PI3K, NF κ B and JNK MAPK pathways.

Thibaut Quillard, Stéphanie Coupel, Juliette Fitau and Béatrice Charreau
Cell Signaling World, Luxembourg, Luxembourg, 2006

The Adaptor Molecule Lnk Negatively Regulates Tumor Necrosis Factor- α -dependent VCAM-1 Expression in Endothelial Cells through Inhibition of the ERK1 and -2 Pathways^{*}

Received for publication, October 7, 2005, and in revised form, April 20, 2006. Published online April 27, 2006. DOI 10.1074/jbc.M530997300

Juliette Fitau¹, Gwénila Boulday², Flora Coulon, Thibaut Quillard, and Béatrice Charreau¹

From the INSERM, U643, Nantes, France, Institut de Transplantation et de Recherche en Transplantation, Centre Hospitalier Universitaire, and Université de Nantes, Unité de Formation et de Recherche de Médecine, F-44093 Nantes, France

Lnk, with APS and SH2-B (Src homology 2-B), belongs to a family of SH2-containing proteins with potential adaptor functions. Lnk regulates growth factor and cytokine receptor-mediated pathways implicated in lymphoid, myeloid, and platelet homeostasis. We have previously shown that Lnk is expressed and up-regulated in vascular endothelial cells (ECs) in response to tumor necrosis factor- α (TNF α). In this study, we have shown that, in ECs, Lnk down-regulates the expression, at both mRNA and protein levels, of the proinflammatory molecules VCAM-1 and E-selectin induced by TNF α . Mechanistically, our data indicated that, in response to TNF α , NF κ B/p65 phosphorylation and translocation as well as I κ B α phosphorylation and degradation were unchanged, suggesting that Lnk does not modulate NF κ B activity. However, Lnk activates phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) as reflected by Akt phosphorylation. Our results identify endothelial nitric-oxide synthase as a downstream target of Lnk-mediated activation of the PI3K/Akt pathway and HO-1 as a new substrate of Akt. We found that sustained Lnk-mediated activation of PI3K in TNF α -activated ECs correlated with the inhibition of ERK1/2 phosphorylation, whereas phosphorylation of p38 and c-Jun NH₂-terminal kinase (JNK) mitogen-activated protein kinases (MAPKs) was unchanged. ERK1/2 inhibition decreases VCAM-1 expression in TNF α -treated ECs. Collectively, our results identify the adaptor Lnk as a negative regulator in the TNF α -signaling pathway mediating ERK inhibition and suggest a role for Lnk in the interplay between PI3K and ERK triggered by TNF α in ECs.

plish this function, ECs must control vascular tone and leukocyte adhesion as well as coagulation and thrombosis. However, when ECs are exposed to proinflammatory stimuli, they become activated and promote vasoconstriction and leukocyte adhesion and activation, as well as coagulation and thrombosis (1, 2). These functional changes are due to the expression by activated ECs of a series of proinflammatory genes encoding adhesion molecules, cytokines/chemokines, and costimulatory and procoagulant molecules. EC activation and subsequent injury is a prominent feature associated with acute and/or chronic inflammation such as occurs during hypoxia (3), endotoxin shock (4), arteriosclerosis (5), ischemia-reperfusion injury (6), and acute or chronic graft rejection (7).

Critically, cytokine-treated ECs express *de novo* a set of cell adhesion molecules, namely E-selectin, and integrin ligands, such as intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), which can interact with blood leukocytes (1, 2, 8). Cytokine-activated ECs also secrete and display chemokines, which stimulate leukocyte chemokinesis (9). The leukocyte integrins LFA-1 and VLA-4 are the counterreceptors for ICAM-1 and VCAM-1 on ECs, and enhanced interactions produce firm attachment to the ECs. A central role of TNF in inflammation has been established by the elucidation of signaling pathways mediated by TNF in ECs (10). Tumor necrosis factor signaling in ECs involves several pathways, including the NF κ B, the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), and members of the MAP3K (mitogen-activated protein kinase kinase kinase) family pathways. Signaling is initiated when ligand-occupied TNF receptors recruit the binding of intracellular adaptor proteins TRADD (TNF receptor-associated death domain protein), RIP (receptor-interacting protein), and TRAF2 (TNF receptor-associated factor 2). The physiological downstream targets of RIP and TRAF2 remain uncertain. Moreover, potential cross-talk between TNF-induced signaling pathways (i.e. NF κ B, PI3K, MAPKs) is not well established.

Lnk, with the closely related proteins APS and Src homology 2-B (SH2-B), belongs to a subfamily of SH2-containing proteins

In their normally quiescent state, endothelial cells (ECs)¹ maintain blood flow, allowing the continuous traffic of plasma and cellular constituents between blood and tissues. To accom-

phatidylinositol 3-kinase; TNF α , tumor necrosis factor- α ; ICAM-1, intercellular adhesion molecule-1; VCAM-1, vascular cell adhesion molecule-1; eNOS, endothelial nitric-oxide synthase; SH, Src homology; FCS, fetal calf serum; RES, internal ribosome entry site; GFP, green fluorescent protein; Ad, adenovirus; PBS, phosphate-buffered saline; RT, reverse transcription; MEK, mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase kinase.

^{*} The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¹ Supported by fellowships from La Société Francophone de Transplantation, La Société de Néphrologie and La Fondation ProGreff.

² Supported by a fellowship from the Fondation pour la Recherche Médicale. Present address: Children's Hospital, Division of Nephrology, Boston, MA 02115.

³ To whom correspondence should be addressed: INSERM U643, IUT, CHU Hôtel-Dieu, 30 Bd Jean Monnet, F-44093 Nantes, France. Tel.: 33-240-087-410; Fax: 33-240-087-411; E-mail: Beatrice.Charreau@univ-nantes.fr.

⁴ The abbreviations used are: EC, endothelial cell; ERK1/2, extracellular signal-regulated kinases 1 and 2; HUVEC, human umbilical vein EC; JNK, c-Jun NH₂-terminal kinase; MAPK, mitogen-activated protein kinase; PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase; TNF α , tumor necrosis factor- α ; ICAM-1, intercellular adhesion molecule-1; VCAM-1, vascular cell adhesion molecule-1; eNOS, endothelial nitric-oxide synthase; SH, Src homology; FCS, fetal calf serum; RES, internal ribosome entry site; GFP, green fluorescent protein; Ad, adenovirus; PBS, phosphate-buffered saline; RT, reverse transcription; MEK, mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase kinase.



Tribbles-1 as a Novel Biomarker of Chronic Antibody-Mediated Rejection

Joanna Ashton-Chess,^{*} Magali Giral,^{*} Michael Mengel,[‡] Karine Renaudin,[‡] Yann Foucher,^{*,§} Wilfried Gwinner,^{||} Christophe Braud,^{*} Emilie Dugast,^{*} Thibaut Quillard,^{*} Pamela Thebault,^{*} Elise Chiffolleau,^{*} Cécile Braudeau,^{*} Béatrice Chamau,^{*} Jean-Paul Souillou,^{*} and Sophie Brouard^{*}

^{*}INSERM, U643, and Centre Hospitalier Universitaire Nantes, Institut de Transplantation et de Recherche en Transplantation, Nantes, France; [†]Université de Nantes, Faculté de Médecine, Nantes, France; [‡]Institut für Pathologie and Abteilung für Nephrologie, Medizinische Hochschule Hannover, Hannover, Germany; [§]CHU Nantes, Service d'Anatomie Pathologique, Nantes, France; and ^{||}University of Montpellier I, Clinical Research Institute, Department of Biostatistics, Montpellier, France

ABSTRACT

Diagnosis of the specific cause of late allograft injury is necessary if more personalized and efficient immunosuppressive regimens are to be introduced. This study sought previously unrecognized biomarkers for specific histologic diagnoses of late graft scarring by comparison of gene sets from published microarray studies. Tribbles-1 (TRIB1), a human homolog of *Drosophila* tribbles, was identified to be a potentially informative biomarker. For testing this, mRNA expression in 76 graft biopsies, 71 blood samples, and 11 urine samples were profiled from independent cohorts of renal transplant patients with different histologic diagnoses recruited at two European centers. TRIB1 but not TRIB2 or TRIB3 was found to be a potential blood and tissue biomarker of chronic antibody-mediated rejection, an active immune-mediated form of chronic allograft failure associated with a poor prognosis. TRIB1 mRNA levels in peripheral blood mononuclear cells discriminated patients with chronic antibody-mediated rejection from those with other types of late allograft injury with high sensitivity and specificity. TRIB1 was also upregulated in a rodent model of chronic cardiac vasculopathy, suggesting that this biomarker may be useful in other solid-organ transplants and across species. It was determined that TRIB1 is expressed primarily by antigen-presenting cells and activated endothelial cells. Overall, these data support the potential use of TRIB1 as a biomarker of chronic antibody-mediated allograft failure.

J. Am. Soc. Nephrol. 19: 1116–1127, 2008. doi: 10.1681/ASN.2007101056

Chronic allograft injury severely impedes successful kidney transplantation.^{1,2} Deciphering the mechanisms of such late graft loss would enable more personalized treatment strategies but is hindered by the difficulty in assigning specific diagnoses. Recently, chronic allograft nephropathy (CAN), the nonspecific term used to describe all manners of late graft scarring, was ousted for the term “interstitial fibrosis and tubular atrophy” (IF/TA), to be used in cases in which no underlying cause can be identified.³ IF/TA can be the result of mechanisms that are of unknown cause, non-immune mediated (e.g., as a result of function overload⁴ or calcineurin inhibitor toxicity (CNI tox)⁵) or immune mediated (e.g., chronic antibody-mediated rejection [AMR]).⁶

Distinguishing these different causes currently requires an invasive biopsy procedure. The discovery of novel and less invasive surrogate biomarkers of these different causes of late graft failure would facilitate the introduction of more targeted immu-

Received October 1, 2007. Accepted January 2, 2008.

Published online ahead of print. Publication date available at www.jasn.org.

Correspondence: Pr. Jean-Paul Souillou, (INSERM U643, CHU Nantes) Des, 30 Bd Jean Monnet, 44093 Nantes, France, Cedex 1. Phone: +33-240-08-74-70; Fax: +33-240-08-74-71; E-mail: jean-paul.souillou@university-nantes.fr, sophie.brouard@university-nantes.fr

Copyright © 2008 by the American Society of Nephrology

Article Annexe Chiron *et al*

TLR3 activation induces various fates of Multiple Myeloma cells

David Chiron^{*}, Catherine Pellat-Deceunynck^{*}, Martine Amiot^{*}, **Thibaut Quillard**[†], Béatrice Charreau[†], Régis Bataille^{*}, and Gaëtan Jego^{*}

^{*}INSERM, UMR892, Nantes, France.

[†]INSERM UMR643, Nantes, France

Running title: TLR3 activation of Multiple Myeloma

Scientific category: Neoplasia

This study was supported by grants from La Ligue Contre le Cancer (équipe labélisée 2008).

Keywords: Multiple myeloma, Toll-like receptors, IFN, Poly(IC).

Dr. Gaëtan Jego, INSERM UMR892,
Centre de recherche en cancérologie Nantes atlantique
9 quai Moncousu, 44093 Nantes Cedex 01
Tel : (33) 2 40 08 47 93
Fax : (33) 2 40 08 47 78
E-Mail : gaetanjego@yahoo.fr

Importance de la Voie Notch dans la Dysfonction Endothéliale en Transplantation : Régulation et Fonctions des Récepteurs Notch2 et Notch4

Notch joue un rôle important dans la survie, la prolifération et la transdifférenciation des cellules endothéliales (CE). Ces mécanismes sont tout particulièrement importants dans l'artériosclérose du greffon (AG). L'objectif de ce travail est de définir la régulation et le rôle de Notch dans la dysfonction des CE associée à l'AG.

Nous avons tout d'abord étudié la régulation des molécules Notch (récepteurs, ligands et effecteurs) au cours de l'activation des CE. Ainsi, le TNF α oriente le profil Notch vers une forte diminution de Notch4 et une augmentation de Notch2, respectivement par les voies NF κ B et PI $_3$ K. Cet effet est toutefois associé à une baisse globale de l'activité CBF1.

La baisse du récepteur endothélial Notch4 est, de plus, associée à l'AG dans un modèle d'allogreffe cardiaque chez le rat où le TNF α , TGF β et IL10 sont fortement exprimés. Le blocage de Notch4 et de hes1 par ARN interférence favorise l'expression de VCAM-1, induit l'apoptose et altère la cicatrisation endothéliale.

L'expression constitutive de Notch2ICD grâce à un adénovirus recombinant induit l'apoptose des CE par une forte répression de gènes anti- (survivine, April) et pro-apoptotiques (Bim, DAPK2, HRK, DR5, CD40). La fonction pro-apoptotique de N2ICD dépend essentiellement de l'inhibition de la survivine. L'extinction de Notch2 augmente l'expression de la survivine et protège les CE de l'apoptose.

L'ensemble de ces travaux montre une interaction entre les voies du TNF et Notch au cours de la dysfonction endothéliale, propose un rôle pour Notch4 dans la prévention de la dysfonction endothéliale dans l'AG et démontre l'importance de Notch2 dans la survie des CE par la régulation de la survivine.

Mots-clés : Notch, dysfonction endothéliale, artériosclérose du greffon, TNF, apoptose

Involvement of Notch Signaling in Endothelial Dysfunction in Transplantation : Regulation and Functions of Notch2 and Notch4 Receptors

Notch plays major roles in endothelial cells (EC) survival, proliferation and transdifferentiation. These events are particularly implicated in transplant arteriosclerosis (TA). This work aims to define Notch molecules regulation and its functional relevance in graft EC.

We first studied Notch family members (receptors, ligands and effectors) regulation during EC activation by cytokines. We show that TNF α induced a switch in Notch expression pattern by a strong down-regulation of Notch4 and an increase in Notch2, respectively dependent on NF κ B and PI3K pathways. This effect is associated with a global decrease in CBF1 activity and an opposite regulation of hes1 and hey1.

Decrease in EC-restricted Notch4 expression is also associated with TA in a rat cardiac allograft model where TNF α , TGF β and IL10 are strongly expressed. Inhibition of Notch4 and hes1 by siRNA enhances VCAM1 expression, induces apoptosis and impairs endothelial injury repair, suggesting that Notch4 expression is required to maintain EC survival and quiescence.

To study the role of Notch2 in EC, we constructed a recombinant adenovirus for Notch2ICD (N2ICD). Constitutive expression of N2ICD leads to EC apoptosis associated with a drastic repression of pro- (survivin, april) and anti-apoptotic genes (bim, DAPK2, HRK, DR5, CD40). Effect of N2ICD is mainly dependent on survivin inhibition. Accordingly, Notch2 knock-down increases survivin expression and protects EC from anoikis.

Altogether, our results reveal crosstalks between TNF and Notch signaling during endothelial dysfunction, propose a role for Notch4 in preventing TA-related EC dysfunction and for Notch2 role in EC survival through survivin regulation.

Keywords : Notch, endothelial dysfunction, transplant arteriosclerosis, TNF, apoptosis