

UNIVERSITÉ DE NANTES

FACULTÉ DE MEDECINE

École doctorale **BIOLOGIE SANTÉ**

Année 2010

Caractérisation des fonctions régulatrices
de la protéine adaptatrice Lnk (SH2B3)
dans l'endothélium vasculaire et application pour la
prévention du rejet en xénotransplantation

THÈSE DE DOCTORAT

Discipline : Biologie Médecine Santé

Spécialité : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Présentée et soutenue publiquement par

DEVALLIERE Julie

Le 18 octobre 2010, devant le jury ci-dessous

Rapporteurs : Corinne ALBIGES-RIZO, Docteur, Grenoble

Thierry HAUET, Professeur d'université, Poitiers

Examineurs : Gwénola BOULDAY, Docteur, Paris

Nuala MOONEY, Docteur, Paris

Directeur de Thèse: Béatrice CHARREAU, Docteur, Nantes

Sommaire

Abréviations.....	6
Liste des figures	86
AVANT-PROPOS	87
La transplantation	87
I. Historique.....	87
II. Problématique et enjeux.....	88
INTRODUCTION GENERALE	91
L'endothélium	92
I. Présentation	93
1. Historique	93
2. Hétérogénéité des CE	94
II. Les fonctions de l'endothélium vasculaire	95
1. La vasculogenèse et l'angiogenèse	96
2. L'hémostase	98
3. Le tonus vasculaire.....	99
4. L'inflammation	102
La protéine adaptatrice Lnk (SH2B3).....	109
I. Les protéines adaptatrices de la famille SH2B	109
1. Structure générale	109
2. La protéine SH2B1.....	111
3. La protéine APS (SH2B2)	113
II. Les fonctions de Lnk dans les cellules d'origine hématopoïétique	116
1. Rôles de Lnk dans les cellules lymphoïdes	117
2. Rôles de Lnk dans les HSC et les progéniteurs hématopoïétiques	119
3. Rôles de Lnk dans les cellules myéloïdes	122
III. Les fonctions de Lnk dans les cellules endothéliales.....	126
1. Rôles de Lnk dans les progéniteurs endothéliaux.....	126
2. Rôles de Lnk dans les cellules endothéliales différenciées	129

OBJECTIFS DE LA THESE	130
RESULTATS.....	ERREUR ! SIGNET NON DEFINI.
PARTIE I : FONCTIONS REGULATRICES DE LA PROTEINE ADAPTATRICE LNK DANS LA VOIE DES INTEGRINES DES CE HUMAINES.....	135
Présentation de la voie des intégrines et des points d'adhésion.....	136
I. La famille des intégrines.....	136
1. Structure générale	136
2. L'activation des intégrines	138
3. Les grandes fonctions des intégrines dans les CE	141
II. Les points d'adhésion.....	144
1. La diversité des points d'adhésion.....	144
2. La structure des points d'adhésion	147
3. Une protéine des adhésions focales : l' α - parvine	149
III. Le cytosquelette d'actine et la migration cellulaire	157
1. L'organisation de l'actine	157
2. Les rôles de la F-actine dans le processus de migration	158
Article 1 : Lnk est un régulateur de la voie des intégrines dans les CE et module l'adhésion et la migration cellulaires par son action sur l'α-parvine	163
PARTIE II : ROLE PROTECTEUR DE LA PROTEINE ADAPTATRICE LNK DANS L'ACTIVATION ET L'APOPTOSE DES CE PORCINES.....	200
Présentation de la xénotransplantation	202
I. Les différents types de rejet en xénotransplantation	202
1. Le rejet suraigu	202
2. Le rejet xénogénique retardé ou rejet aigu humoral xénogénique	203
3. Le rejet cellulaire.....	205
II. Les stratégies de prévention du rejet par modifications génétiques du donneur.....	206
III. La protection du greffon par accommodation	213
1. Définition du processus d'accommodation	213
2. Les gènes protecteurs de l'endothélium	215

Article 2 : Le transfert du gène Lnk prévient les CE porcines de l'activation et de l'apoptose : implications dans la cytoprotection de la xéno greffe 218

PARTIE III: IMPORTANCE DE LA VOIE NOTCH DANS LA DYSFONCTION ENDOTHELIALE EN TRANSPLANTATION: REGULATION ET FONCTIONS DES RECEPTEURS NOTCH2 ET NOTCH4245

Article 3 : L'inflammation induit la modification du phénotype Notch dans les CE : implication de Notch2 et Notch4 dans la dysfonction endothéliale 248

Article 4 : L'activation de Notch2 dans les CE induit l'apoptose en bloquant l'expression de la survivine 250

DISCUSSION ET PERSPECTIVES ERREUR ! SIGNET NON DEFINI.

BIBLIOGRAPHIE273

Remerciements

Je remercie le Pr Jean-Paul Soullou et le Dr Ignacio Anegon de m'avoir permis d'effectuer ma thèse au sein de l'unité U643. Leur engagement et leurs efforts nous permettent d'évoluer dans un laboratoire dynamique, nous offrant de bonnes conditions de travail.

Un merci tout particulier à Béatrice pour m'avoir accueillie dans son équipe et tant appris durant ces trois années. Je te remercie pour ton soutien, ta disponibilité et la confiance que tu m'as accordée. Ton exigence et ta rigueur scientifique m'ont aidée à progresser et m'ont confortée dans le choix de ce métier.

Je remercie chaleureusement le Dr Albigès-Rizo et le Pr Hauet, d'avoir pris le temps d'évaluer ce travail en tant que rapporteurs. J'adresse également mes remerciements au Dr Mooney et au Dr Boulday pour avoir accepté de participer à ce jury.

Un grand merci à tous les membres de l'équipe 7 (forever), Nathalie, Christophe, notre petit dernier Pierre ou plutôt Peter Thunder, et bien sûr Mathias, mon binôme et voisin de bureau, qui a supporté ma mauvaise humeur tout en gardant le sourire et son humour légendaire. Je pense également à ceux qui sont désormais partis Annabelle, Thibaut et Flora.

Abréviations

ADCC :	<i>antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity</i>
AF :	adhésions focales
AGM :	aorte-Gonade-Mésonéphros
AHXR :	<i>acute humoral xenograft rejection</i>
ANX :	anticorps naturels xénogéniques
AP1 :	<i>activator protein 1</i>
APS :	<i>adapter protein with PH and SH2 domain</i>
AT :	anti-thrombine
BCR :	<i>B cell receptor</i>
bFGF :	<i>basic fibroblast growth factor</i>
CE :	cellule endothéliale
CF :	complexes focaux
CPA :	cellules présentatrices de l'antigène
CML :	cellule musculaire lisse
c-mlp :	<i>myeloproliferative leukemia virus protooncogene</i>
COX 1 :	cyclooxygénase 1
DAG :	diacylglycérol
DII :	<i>Delta-like</i>
DED :	<i>death effector domain</i>
DXR :	<i>delayed xenograft rejection</i>
EDCF :	<i>endothelium-derived contracting factors</i>
EDHF :	<i>endothelium-derived hyperpolarizing factors</i>
EDRF :	<i>endothelium-derived relaxing factors</i>
EPCR :	<i>endothelial protein C receptor</i>
Epo :	érythropoïétine
ET1, ET-2 :	endothéline
FADD :	<i>Fas-associated death domain</i>
FAK :	<i>focal adhesion protein</i>
FGF :	<i>fibroblast growth factor</i>
αGal :	Galalpha1-3Gal1-4ClcNac-R
GalT :	α1,3-galactosyltransférase
GDNF :	<i>glial cell-lined derived neurotrophic factor</i>
GDP :	guanosine diphosphate
GMP :	guanosine monophosphate
GTP :	guanosine triphosphate
HAEC :	<i>human artery endothelial cell</i>
HAR :	<i>hyperacute rejection</i>
HSC :	<i>hematopoietic stem cell</i>
HUVEC :	<i>human umbilical vein endothelial cell</i>
ICAM-1 :	<i>intercellular adhesion molecule-1</i>
IGF-1 :	<i>insulin-like growth factor-1</i>
ILK :	<i>integrin-linked kinase</i>
iNOS :	<i>inducible NO synthase</i>
IP3 :	inositol-triphosphate
IPP :	ILK PINCH parvine
IRAK :	<i>IL1 receptor associated kinase</i>

KO :	knock-out
KI :	knock-in
LB :	lymphocytes B
LIM :	<i>Lin11, Isl-1, Mec-3 proteins</i>
LT :	lymphocytes T
MAPK :	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MLC :	<i>myosin light chain</i>
MLCK :	<i>myosin-light-chain kinase</i>
MMP :	<i>matrix metalloproteinase</i>
NECD :	<i>Notch extra-cellular domain</i>
NF κ B :	<i>nuclear factor kappa b</i>
NGF :	<i>nerve growth factor</i>
NICD :	<i>Notch intra-cellular domain</i>
NO :	monoxide d'azote
NOS3 :	<i>NO synthase 3</i>
NTM :	<i>Notch transmembraneous domain</i>
PAEC :	<i>Porcine artery endothelial cell</i>
PAF :	<i>platelet activating factor</i>
PAI-1 :	<i>plasminogen activator inhibitor-1</i>
PDGF :	<i>platelet derived growth factor</i>
PECAM1 :	<i>platelet-endothelial cell adhesion molecule 1</i>
PERV :	<i>porcin endogenous retrovirus</i>
PGI ₂ :	prostacycline
PI3K :	Phosphatidylinositol 3-kinase
PIP2 :	phosphatidyl-inositol-4,5-diphosphate
PIP3 :	phosphatidyl-inositol-3,4,5-triphosphate
PKG :	protéine kinase G
RCPG :	récepteur couplé aux protéines G
RIP1 :	<i>receptor-interacting protein 1</i>
SCF :	<i>stem cell factor</i>
SH2B :	<i>Src homology 2-B</i>
SMGT :	<i>sperm-mediated gene transfer</i>
TCR :	<i>T cell receptor</i>
TESK1 :	<i>testicular protein kinase 1</i>
TGF β :	<i>transforming growth factor beta</i>
TIRAP :	<i>Toll/IL1 receptor accessory protein</i>
TM :	thrombomoduline
TNF :	<i>tumor necrosis factor</i>
Tpo :	thrombopoïétine
tPA :	<i>tissue-type plasminogen activator</i>
TPFI :	<i>tissue pathway inhibitor factor</i>
TRAIL :	<i>TNF-related apoptosis inducing ligand</i>
TRADD :	<i>TNFR-1 associated death domain protein</i>
TRAF :	<i>TNFR-associated factor</i>
uPA :	<i>urokinase plasminogen activator</i>
VCAM-1 :	<i>vascular cell adhesion molecule-1</i>
VEGF :	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
WPB :	<i>Weibel-Palade Bodie</i>
vWF :	von Willebrand factor

Liste des figures

FIGURE 1. STRUCTURE DES VAISSEAUX SANGUINS .	92
FIGURE 2. EXEMPLES DE L'HETEROGENEITE PHENOTYPIQUE DE L'ENDOTHELIUM.....	18
FIGURE 3. PRINCIPALES FONCTIONS DE L'ENDOTHELIUM VASCULAIRE ET MOLECULES ASSOCIEES.	96
FIGURE 4. CONTROLE DE L'HEMOSTASE PAR LES CE AU REPOS.	99
FIGURE 5. SYNTHESE ET EFFET DU MONOXYDE D'AZOTE SUR LE MUSCLE LISSE VASCULAIRES.	101
FIGURE 6. ACTIVATION DE TYPE 1 AU COURS DE LA REPOSE INFLAMMATOIRE AIGUË DES CELLULES ENDOTHELIALES	105
FIGURE 7. CASCADE D'ADHERENCE DES LEUCOCYTES SUR L'ENDOTHELIUM.	107
FIGURE 8. ACTIVATION DE TYPE 2 AU COURS DE LA REPOSE INFLAMMATOIRE AIGUË DES CELLULES ENDOTHELIALES	108
FIGURE 9. STRUCTURE PROTEIQUE DES MEMBRES DE LA FAMILLE SH2B.....	110
FIGURE 10. SPLENOMEGALIE DES SOURIS LNK ^{-/-}12
0	
FIGURE 11. FONCTIONS DE LNK DANS LES CELLULES D'ORIGINE HEMATOPOÏËTIQUE.	125
FIGURE 12. STRUCTURE GENERALE D'INTEGRINES.....	137
FIGURE 13. LA FAMILLE DES INTEGRINES.	138
FIGURE 14. REGULATION DES INTEGRINE.	140
FIGURE 15. INTEGRINES EXPRIMEES PAR LES CE VASCULAIRES ET LEURS PRINCIPAUX LIGANDS.....	141
FIGURE 16. CARACTERISTIQUES DES PRINCIPALES ADHESIONS A LA MEC.	146
FIGURE 17. ATLAS DE L'ADHESOME DES INTEGRINES REPRESENTANT	147
FIGURE 18. SCHEMA REPRESENTANT LA COMPLEXITE DU RESEAU DES PRINCIPALES PROTEINES CONSTITUANT LES AF.	149
FIGURE 19. STRUCTURE DE LA PROTEINE ALPHA-PARVINE ET SITES D'INTERACTION AVEC SES DIFFERENTS PARTENAIRES.....	150
FIGURE 20. MODELE DE LA REGULATION DE L'ADHESION PAR L'A-PARVINE ET TESK1	155
FIGURE 21. POLYMERISATION DE L'ACTINE ET FACTEURS DE NUCLEATION.	158
FIGURE 22. STRUCTURES D'ACTINE IMPLIQUEES DANS LA MIGRATION ENDOTHELIALE (HUVEC)	159
FIGURE 23. SCHEMA REPRESENTANT LE CYTOSQUELETTE D'ACTINE DANS UNE CELLULE EN MIGRATION.	162
FIGURE 24. REJET SURAIGU.	203
FIGURE 25. REJET XENOGENIQUE RETARDE OU REJET AIGU HUMORAL XENOGENIQUE.....	204
FIGURE 26. REJET CELLULAIRE.	206
FIGURE 27. SCHEMA DE LA CASCADE DU COMPLEMENT ILLUSTRANT LES TROIS VOIES D'ACTIVATION	210
FIGURE 28. EXPRESSION ET ACTIVATION DE LA VOIE DE SIGNALISATION NOTCH.	246
FIGURE 29. LE CYCLE DES RHOGTPASES.	258
FIGURE 30. SIGNALISATION DES RHO GTPASES REGULANT L'ORGANISATION DES FILAMENTS D'ACTINE.	142

Avant-propos

La transplantation

La transplantation se définit comme le transfert de cellules, de tissus ou d'organes d'un individu donneur à un individu receveur. L'allotransplantation est la greffe entre individus d'une même espèce, c'est le cas de la plupart des transplantations réalisées chez l'homme. La xénotransplantation est le transfert d'organes ou de cellules entre espèces différentes, par exemple du porc au primate.

I. Historique

Le concept de la transplantation d'organes chez l'homme est très ancien. On retrouve dès le III^{ème} siècle des fresques représentant les premières scènes de greffes. Si le XIX^{ème} siècle est parsemé d'expériences de greffes tissulaires (peau, joues de lapin, queues de rat), il faut attendre la seconde moitié du XX^{ème} siècle pour que la transplantation se révèle être une alternative thérapeutique sérieuse pour pallier la perte de fonction d'un organe. L'histoire de la greffe d'organes se concentre donc sur le XX^{ème} siècle et est jalonnée de découvertes fondamentales et indispensables qui ont permis l'évolution de cette thérapeutique.

La première avancée majeure fut le développement de l'anastomose vasculaire (suture vasculaire) par Emerich Ullmann, Alexis Carrel, Mathieu Jaboulay et C.C. Guthrie qui donna suite à de nombreuses expériences de greffes animales. En 1906, le chirurgien lyonnais Jaboulay réalisa la première xénotransplantation, c'est à dire une greffe d'organe entre un donneur et un receveur d'espèces différentes (Jaboulay, 1906). Cette tentative de greffe de rein de chèvre au coude d'une jeune femme accouchée en insuffisance rénale majeure par néphrite, se solda par un échec immédiat et le décès de la patiente. En 1933, le chirurgien Voronoy réalisa la première greffe rénale à Kiev, en Ukraine. Il greffa le rein d'un homme décédé au niveau de l'aîne d'une jeune malade de 26 ans en coma urémique par absorption

de mercure. La jeune greffée mourût quatre jours après la transplantation. Serguey Voronoy acquit alors la conviction que « l'échec était d'origine immunologique ». La II^{ème} guerre mondiale marqua un temps d'arrêt dans les expérimentations sur l'homme, mais les travaux reprurent rapidement dans les années 50 et se concentrèrent sur la greffe rénale, notamment à Paris et Boston, villes phares de la greffe rénale sur donneurs vivants. Au fil des années, la technique s'améliora, que ce soit dans la préparation de l'organe ou dans l'acte chirurgical, permettant d'obtenir jusqu'à plusieurs mois de survie. Cependant, toutes les tentatives se heurtèrent à un obstacle majeur et incompris, le rejet de l'organe transplanté. C'est en 1952 qu'un début de réponse est apporté par les travaux de Dausset sur le système HLA, faisant le lien entre l'histocompatibilité et le rejet de greffe (Dausset et al., 1965). En 1954, la démonstration de l'origine immunologique du rejet est faite par la greffe réussie entre deux vrais jumeaux, réalisée par John Merrill et Joseph Murray. Mais médecins et biologistes ne peuvent se résoudre à l'utilité de la greffe uniquement dans le cas de jumeaux, et c'est le recours aux immunosuppresseurs qui permettra de franchir progressivement cette incompatibilité biologique. Cependant, malgré les progrès réguliers de la chirurgie et de la prise en charge des patients, les immunosuppresseurs tels que les corticoïdes ne parviennent pas à diminuer efficacement la fréquence des rejets. La découverte de la cyclosporine en 1969, puis de ses propriétés immunosuppressives par Jean François Borel (Borel et al., 1976) en 1972 (Laboratoires Sandoz, Bâle) ont conduit à sa mise sur le marché dans les années 80 et marqua un tournant dans l'histoire de l'immunosuppression et de la transplantation. Cette nouvelle génération de médicament anti-rejet a permis de prolonger nettement la survie des greffons et a contribué à l'essor de la transplantation.

II. Problématique et enjeux

En France, le nombre de greffes a beaucoup augmenté ces 30 dernières années et est passé de 666 en 1980 à 4580 en 2009 (Agence de la Biomédecine, Rapport annuel, Bilan des activités 2009). Si cette forte croissance montre les progrès et le succès de cette stratégie thérapeutique, un nouveau problème s'ajoute aujourd'hui aux obstacles biologiques et techniques : le manque d'organe. En effet, le nombre de greffes réalisées chaque année

progresses désormais peu en raison du manque de greffons disponibles, alors que le nombre de patients en liste d'attente ne cesse d'augmenter, pour atteindre 8244 personnes en 2009 selon l'Agence de la Biomédecine. Les efforts d'information pour promouvoir le don d'organes de sujets en état de mort encéphalique ou de donneurs vivants, ne suffisent plus et d'autres alternatives, comme la xénotransplantation, sont aujourd'hui envisagées. Malgré ces difficultés, les recherches continuent afin d'augmenter la durée de vie des greffons et trois types de rejets sont désormais connus et caractérisés.

Le rejet suraigu survient dans les premières heures qui suivent la greffe. Il est dû à la présence, chez le receveur, d'anticorps préformés contre les antigènes de groupes sanguins (Kourilsky et al., 1987) et/ou des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) du donneur (Williams et al., 1968). Ces anticorps sont produits à la suite de pré-sensibilisations (transfusions sanguines, grossesse, transplantations antérieures) et provoquent des thromboses vasculaires et la nécrose rapide du greffon par ischémie. Ce type de rejet est aujourd'hui évité par la recherche systématique de ces anticorps (test de cross-match) qui permet la sélection optimale des receveurs.

Le rejet aigu intervient dès la première semaine après la greffe. Il est dû 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, par exemple, des taux de survie des greffons rénaux et cardiaques de 92% et 94% à un an de la transplantation grâce à l'emploi systématique de traitement immunosuppresseurs (Agence de la Biomédecine, Rapport annuel, Bilan des activités 2009).

Enfin, la perte du greffon à long terme reste mal caractérisée. Ce rejet chronique, appelé dysfonction chronique du greffon, est multifactoriel, avec des composantes non-immunologiques comme l'ischémie-reperfusion, ou immunologiques. L'artériosclérose du greffon qui le caractérise, dans le cœur et le rein notamment, se traduit par l'occlusion progressive de la lumière des vaisseaux sanguins du greffon en raison d'une prolifération des cellules musculaires lisses et des cellules endothéliales dans la néointima. La survenue du rejet chronique n'est toujours pas contrôlée, c'est pourquoi la compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires intervenant dans ce rejet représente un enjeu majeur en transplantation.

Lors d'une greffe, l'endothélium du greffon est l'interface physique entre le donneur et le receveur. Il est le premier en contact avec les éléments humoraux et cellulaires du receveur et participe activement aux rejets aigu et chronique du greffon. C'est pourquoi l'étude du processus d'activation des cellules endothéliales (CE) reste un domaine important de recherche, qui s'attache à identifier les mécanismes et les molécules impliqués dans l'initiation et le contrôle de la dysfonction endothéliale.

INTRODUCTION GENERALE

Introduction générale

L'endothélium

L'endothélium vasculaire, constitué d'une monocouche de CE, représente la limite interne des vaisseaux sanguins (Figure 1). Cette position particulière, entre le sang et le tissu environnant, lui confère un rôle important dans de nombreuses fonctions physiologiques. Ainsi, il apparaît aujourd'hui évident que les CE ne forment pas une surface inerte mais sont en réalité une barrière dynamique permettant de réguler des processus variés tels que l'homéostasie, la perméabilité et le tonus vasculaire, la circulation des cellules sanguines, l'angiogenèse ainsi que l'immunité innée ou adaptative. Cependant, il reste difficile de donner une définition unique de l'endothélium. En effet, les CE présentent une grande hétérogénéité aussi bien structurelle que fonctionnelle selon la taille des vaisseaux, l'organe ou le tissu observé (Gerritsen, 1987).

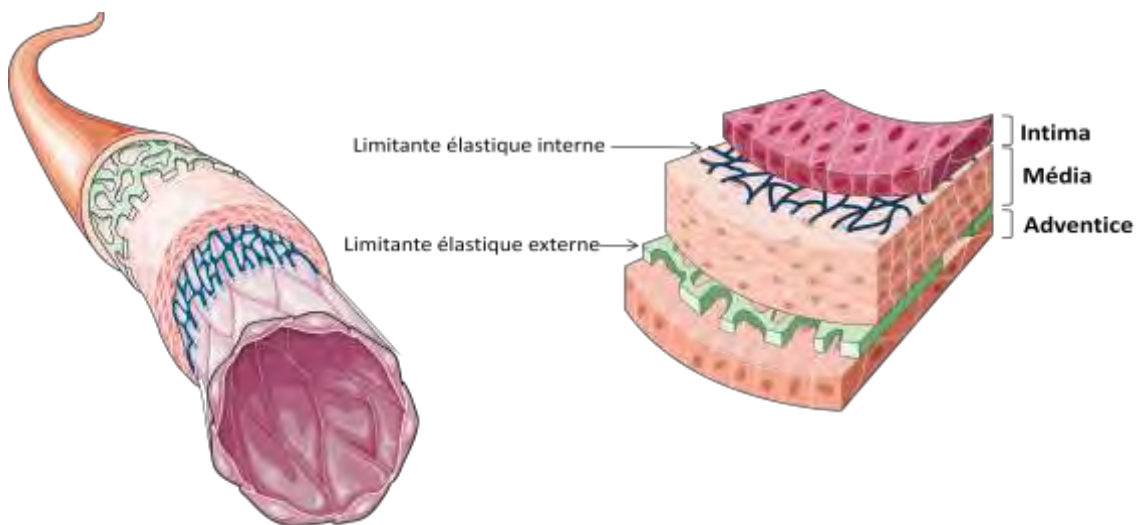


Figure 1. Structure des vaisseaux sanguins (Servier Medical Art). Schématiquement, la paroi des vaisseaux sanguins est constituée de trois couches superposées. La plus externe, l'adventice (*tunica adventitia*), est formée d'un tissu conjonctif, riche en collagène et en fibres élastiques et contenant des fibroblastes et des adipocytes. Elle est séparée par la limitante élastique externe de la média (*tunica media*) constituée principalement de cellules musculaires lisses vasculaires (CML) empilées de façon concentrique. La couche la plus interne appelée intima ou *tunica intima* est constituée d'une monocouche de CE reposant sur la membrane basale et une fine couche de tissu conjonctif. Elle est séparée de la média par une couche de fibres d'élastine et de fibrilline, la limitante élastique interne.

I. Présentation

1. Historique

Hippocrate et Galien représentaient le réseau vasculaire sous la forme de deux systèmes distincts composés d'un côté par les veines et de l'autre par les artères. Galien (131-201) fit une description précise du réseau de veines et d'artères à partir de dissections de porcs, mais interpréta faussement le rôle des organes. Selon lui, les artères permettaient la circulation de l'air et de « l'esprit vital », alors que les veines permettaient le transport du sang formé dans le foie. Cette théorie erronée fut admise pendant plusieurs siècles jusqu'à ce que William Harvey infirme l'hypothèse de Galien en 1628. Par une série d'expériences réalisées sur le chien, Harvey montra la connexion entre artère et veine et démontra que le sang circule au sein d'un réseau fermé. Même s'il ne put directement observer les capillaires, Harvey supposa leur existence. C'est grâce au développement de la microscopie que Marcello Malpighi fut le premier à observer les capillaires sanguins en 1661. En 1865, le terme d'endothélium fut utilisé pour la première fois par l'anatomiste suisse Wilhelm His. La définition originale incluait la couche cellulaire interne des vaisseaux sanguins, lymphatiques et des cavités mésothéliales. Cette définition fut ensuite restreinte à la monocouche cellulaire interne tapissant les vaisseaux sanguins et lymphatiques. Au cours des années 1950-60, la microscopie électronique fut un outil primordial dans la description de l'endothélium et permit notamment l'observation d'organelles caractéristiques comme les cavéoles ou les corps de Weibel-Palade contenant le facteur de Von Willebrand (vWF). Ces observations mirent également en évidence pour la première fois l'hétérogénéité des CE. En 1973, Jaffe *et al.* (Jaffe et al., 1973) ainsi que Gimbrone *et al.* (Gimbrone et al., 1973) isolèrent indépendamment des CE humaines issues de veines ombilicales. La possibilité de cultiver des CE *in vitro* et dès lors de contrôler l'environnement extracellulaire a permis le développement de la biologie cellulaire et l'étude des fonctions et des propriétés des CE. Cependant, il est à noter que les cellules *in vitro* ne sont pas soumises au flux sanguin et aux forces de cisaillement, ce qui perturbe leur état de quiescence. Les CE *in vitro* vont présenter un taux de réplication 10 à 100 fois plus élevé que des CE *in vivo*. Ces différences constituent des limites à l'utilisation des modèles cellulaires.

2. *Hétérogénéité des CE*

L'endothélium dérive du mésoderme *via* la différenciation d'hémangioblastes et d'angioblastes (Augustin et al., 1994). Malgré cette origine commune, les CE vont par la suite présenter une grande hétérogénéité dans leurs structures et leurs fonctions.

Ces différences traduisent la capacité de l'endothélium à répondre aux besoins du tissu sous-jacent. Ainsi, les CE présentent des spécificités tissulaires (cœur, foie, cerveau). Par exemple, les CE de la barrière hémato-encéphalique ont un phénotype très spécialisé non fenestré avec des jonctions serrées et très peu de vésicules de transport. Cette barrière « hémato-encéphalique » permet un contrôle strict des échanges de solutés et de cellules circulantes entre le plasma et l'espace interstitiel cérébral. Au contraire, dans les organes nécessitant une filtration ou un transport transendothélial importants, tels que les glomérules rénaux ou la muqueuse intestinale, l'endothélium est fenestré en continu. Il est pourvu de pores, d'environ 70 nm de diamètre, qui le rendent plus perméable. Enfin, dans certains lits vasculaires, l'endothélium présente des fenestrations larges, une membrane basale peu organisée, et des CE disjointes. C'est le cas des CE sinusoidales du foie qui forment un endothélium fenestré et discontinu. L'endothélium possède donc des propriétés et une perméabilité adaptées à son environnement grâce à sa structure (continue, fenestrée, discontinue) (Pries et Kuebler, 2006).

De plus, les CE sont réparties sur l'ensemble de l'arbre vasculaire et possèdent une fonction et un phénotype différents selon qu'elles appartiennent à une artère, une veine ou un capillaire. L'épaisseur des CE varie de 0,1 µm dans les capillaires à 1 µm dans l'aorte (Florey, 1966). Des études utilisant des marquages immunohistochimiques ont permis de caractériser l'endothélium *in vivo*. Plusieurs groupes ont ainsi montré que différents lits vasculaires expriment de façon spécifique certaines protéines (Figure 2) (Auerbach et al., 1985) (Turner et al., 1987). D'un point de vue fonctionnel, les CE présentent une « division du travail » où chaque type de vaisseau va préférentiellement assurer une fonction physiologique. Les protéines NOS3 (aussi appelé eNOS pour *endothelial NO synthase*) et vWF sont exprimées de façon prédominante, respectivement par les CE des artères et des veines. La synthèse de ces molécules vasorégulatrices montre le rôle important de ce type de vaisseau dans le contrôle du tonus vasculaire et de l'hémostase. L'endothélium des veines est majoritairement responsable de l'extravasation des leucocytes, conférant à cette portion

du système vasculaire un rôle majeur dans l'inflammation (Bjerknes et al., 1986). L'endothélium capillaire, quant à lui, est beaucoup plus perméable que celui des veines ou des artères. En effet, la faible circonférence et la paroi fine des capillaires permettent une très grande surface d'échange entre le sang et les tissus et facilitent donc la diffusion des molécules.

Ainsi, les propriétés et les fonctions des CE sont variables en fonction de l'espèce, de l'organe, de la taille du vaisseau sanguin mais peuvent également présenter des différences entre individus, notamment dans l'expression des molécules du CMH.

Gène/protéine	Distribution*
vWF	V
TFPI	C
EPCR	V/A
tPA	A
TM	V/A/C
NOS3	A
CD39 (NTPDase-1)	A/V; variable dans les C; absent dans les CE normales fenestrées
RPTP μ	A; endothélium capillaire non fenestré
ESM-1 (endocan)	Endothélium adulte des poumons, reins; endothélium tumoraux
MECA-79	Veinules à endothélium haut
GlcNAc6ST	Veinules à endothélium haut
EphrinB2	A
EphB4	V
Notch4	A
Gridlock	A
Sox-13	A
EPAS-1	A
HRT1-3	A
Neuropiline-1	V
Neuropiline-2	A
EG-VEGF signaling	Glande stéroïdogénique
Egr-1	Endothélium du cerveau et du cœur, induit par le VEGF et l'EGF
	Athérosclérose
NF- κ B	Expression préférentielle au niveau des sites de l'athérosclérose

Figure 2. Exemples de l'hétérogénéité phénotypique de l'endothélium. A, artères ; V, veines ; C, capillaires ; vWF, facteur de von Willebrand ; TPFI, inhibiteur du facteur tissulaire ; EPCR, récepteur de la protéine C ; tPA, activateur tissulaire du plasminogène ; TM, thrombomoduline ; NOS3, synthase 3 de NO ; ESM-1, molécule endothéliale spécifique 1. *Type de vaisseau dans lequel le gène (ARNm et/ou protéine) est exprimé de façon prédominante. D'après (Aird, 2005)

II. Les fonctions de l'endothélium vasculaire

L'endothélium forme une surface d'échange considérable répartie le long de l'arbre vasculaire et participe au transport des solutés ou macromolécules à travers les parois vasculaires. Il possède des fonctions endocrine, paracrine et autocrine qui font de lui un organe multifonctionnel. De ce fait, il intervient dans des processus physiologiques variés comme l'homéostasie vasculaire, en régulant les réponses immunes et inflammatoires par le contrôle du passage des leucocytes du sang vers les tissus, le tonus vasculaire, l'hémostasie ou l'angiogenèse (Figure 3). L'endothélium maintient la balance entre vasodilatation et vasoconstriction, entre l'inhibition et la stimulation de la prolifération et de la migration des cellules musculaires et des CE, ainsi que l'équilibre entre thrombose et fibrinolyse. Le déséquilibre de cette balance entraîne la dysfonction endothéliale qui est impliquée dans des pathologies telles que l'athérosclérose (pour revue (Lusis, 2000)), l'angiogenèse associée à la progression tumorale et métastatique (pour revue (Carmeliet et Jain, 2000)), le choc septique (pour revue (Annane et al., 2005)) et le rejet d'allo et xéno greffe (pour revue (Aird, 2006) (Cowan et al., 2009)).

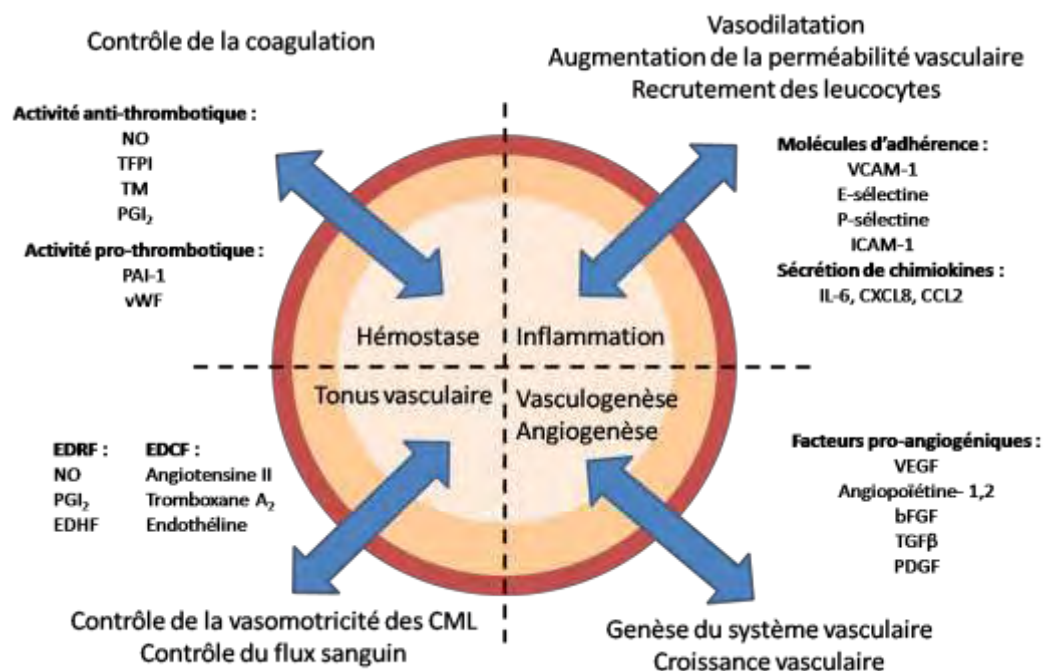


Figure 3. Principales fonctions de l'endothélium vasculaire et molécules associées.

1. La vasculogénèse et l'angiogenèse

Le système cardiovasculaire est le premier à se former lors de la gastrulation embryonnaire. L'organisation *de novo* des CE en vaisseau en l'absence de réseau vasculaire est appelé vasculogénèse et intervient uniquement au cours de l'embryogénèse (Risau et Flamme, 1995). Les CE dérivent de la différenciation successive de cellules mésodermes en hémangioblastes, qui formeront la première structure vasculaire, nommée îlots sanguins primitifs. Les hémangioblastes du centre des îlots donnent naissance aux cellules souches hématopoïétiques (HSC) tandis que les hémangioblastes périphériques se différencient en angioblastes, les précurseurs des CE matures. Sous l'influence de facteurs dont le VEGF (*vascular endothelial growth factor*) et le bFGF (*basic fibroblast growth factor*), les angioblastes et les CE nouvellement formés migrent sur une matrice constituée principalement de collagène et d'acide hyaluronique. Ce processus aboutit à la fusion des îlots sanguins, le remodelage en structures tubulaires et la formation du plexus vasculaire primitif. Les tubules évoluent par la suite en vaisseau plus larges, permettant la vascularisation de l'embryon (Risau et Flamme, 1995).

Contrairement à la vasculogénèse, l'angiogénèse correspond à la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir d'un réseau préexistant. Ce mécanisme intervient dans de nombreux processus physiologiques tels que le développement embryonnaire, la réparation et la régénération tissulaire, mais aussi pathologiques comme le développement tumoral. L'angiogénèse se caractérise par une succession d'événements. Elle débute par la vasodilatation du vaisseau initial qui s'accompagne d'une augmentation de sa perméabilité, suivi de la dégradation de la membrane basale et de la matrice extracellulaire environnante, ce qui aboutit à la migration et à la prolifération des CE activées, par bourgeonnement d'un nouveau tube vasculaire. Les interactions entre cellules endothéliales, matrice extracellulaire, cellules musculaires lisses (CML), cellules peri-endothéliales, fibroblastes et cellules sanguines nucléées sont complexes et dépendent largement du type d'angiogénèse (tumorale, ischémique) et de l'organe dans lequel se déroule ce phénomène. De plus, ce processus nécessite une coordination et des régulations précises de nombreux facteurs pro- et anti-angiogéniques qui interagissent avec divers types cellulaires, vasculaires et extra-vasculaires.

En grande partie sous l'influence du monoxyde d'azote (NO), la vasodilatation est la première étape de l'angiogénèse. L'augmentation de la transcription du gène codant pour le VEGF, en partie régulée par le NO, entraîne une augmentation de la perméabilité

vasculaire en redistribuant les molécules d'adhésion intercellulaire (PECAM-1 et VE-cadhérine) et en modifiant les propriétés des membranes cellulaires par l'activation d'une série de kinases (Eliceiri et al., 1999). L'hyperperméabilité de la paroi vasculaire induite par le VEGF est contrôlée par l'angiopoïétine-1, ligand du récepteur Tie2, qui est un puissant facteur limitant la perméabilité endothéliale (Thurston et al., 2000). L'angiopoïétine-2 est un antagoniste naturel de l'angiopoïétine-1 qui participe au détachement des cellules musculaires lisses de la matrice extracellulaire (MEC) et facilite ainsi la migration des CE. La dégradation de la MEC par des protéases et des métalloprotéinases (MMP) participe également au processus d'angiogenèse, en libérant des facteurs de croissance séquestrés dans la matrice (bFGF, VEGF, IGF-1). Sous l'influence de ces différents facteurs, notamment le VEGF, les CE prolifèrent et migrent dans la MEC pour former un nouveau tube. Pour finir, les CE initialement assemblées en « corde » vont s'organiser en vaisseau avec une lumière, une membrane basale et des cellules murales (pour revue (Carmeliet, 2005) (Carmeliet et Collen, 2000)). Le réseau nouvellement formé est stabilisé par l'action de l'angiopoïétine-1, qui favorise les interactions entre les cellules endothéliales et périendothéliales, ainsi que celle du PDGF (*Platelet derived growth factor*) et du TGF β (*transforming growth factor*) (Madri et al., 1988) (Jain, 2003).

2. L'hémostase

A l'état quiescent, l'endothélium participe au maintien du flux sanguin en présentant une surface anti-thrombotique qui inhibe l'agrégation plaquettaire et la coagulation. Cependant, lors de l'apparition d'une lésion vasculaire, l'endothélium doit au contraire limiter les pertes sanguines en présentant un phénotype pro-coagulant. Il favorise alors la formation d'un thrombus plaquettaire, phénomène appelé hémostase primaire. Dans un second temps, la coagulation plasmatique entraîne la constitution d'un réseau de fibrine insoluble qui consolide le thrombus. La coagulation fait intervenir plusieurs acteurs dont les rôles sont complémentaires : les plaquettes, les protéines plasmatiques et les CE. Ce processus est l'aboutissement d'une cascade de réactions protéolytiques permettant l'activation en chaîne de facteurs plasmatiques de la coagulation, circulant sous forme de précurseurs inactifs, les zymogènes. Le fibrinogène est le substrat final des réactions de coagulation. Cette protéine soluble est transformée en fibrine insoluble par la thrombine. Au

contraire, la réaction de fibrinolyse permet la dissociation du caillot par la transformation du plasminogène en plasmine. La plasmine bloque la formation de fibrine et fragilise ainsi l'agrégat.

Les CE contrôlent principalement la coagulation en modulant la génération ou la disponibilité de la thrombine, molécule pro-coagulante. Au repos, l'endothélium exprime différentes molécules anti-thrombotiques comme l'inhibiteur du facteur tissulaire (TFPI), la thrombomoduline (TM) qui fixe la thrombine et bloque la cascade de coagulation, ou les héparanes sulfates (HS) capables de fixer l'antithrombine pour former un complexe anti-coagulant inhibiteur de la thrombine. D'autres molécules anti-coagulantes comme le récepteur de la protéine C (EPCR), l'ecto-ADPase, la prostacycline (PGI₂) et le monoxyde d'azote (NO) sont exprimées et/ou sécrétées par les CE. L'endothélium module également la fibrinolyse par la sécrétion de l'activateur tissulaire du plasminogène (tPA) qui dégrade le plasminogène en plasmine (pour revue (Bombeli et al., 1997) (Aird, 2007)).

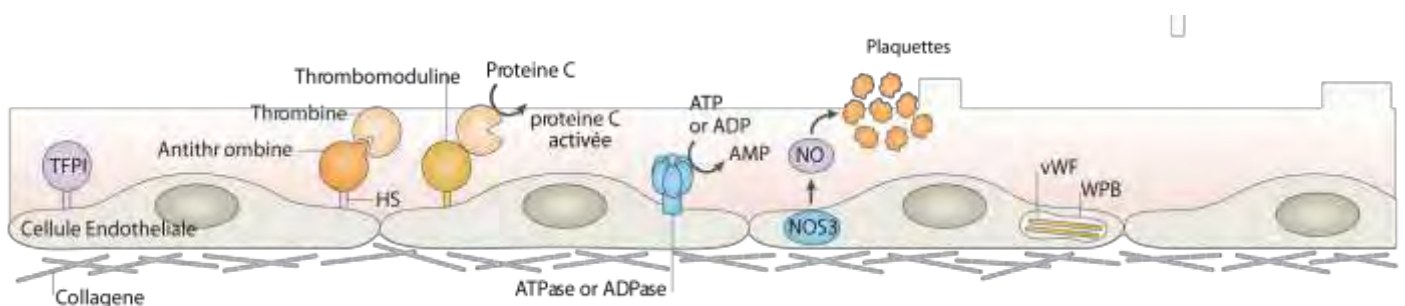


Figure 4. Contrôle de l'hémostase par les CE au repos.

D'après (Pober et Sessa, 2007)

Dans un contexte pro-coagulant, l'endothélium sécrète l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène (PAI-1) qui inhibe le tPA et l'urokinase (uPA). Sa sécrétion est stimulée par des cytokines, des facteurs de croissance et des lipoprotéines impliquées dans la réponse inflammatoire. Ces mécanismes sont impliqués, en clinique humaine, dans la genèse de la coagulation intravasculaire disséminée. Le vWF est également une glycoprotéine clé de la coagulation, stockée dans les corps de Weibel-Palade (WPB) et libérée dans la circulation après activation des CE.

3. Le tonus vasculaire

La vaso-motricité est une propriété majeure des vaisseaux sanguins qui leur permet de modifier leur calibre par la contraction des cellules musculaires lisses (CML) de la média. La régulation du diamètre du vaisseau permet le contrôle du flux sanguin. On désigne par tonus vasculaire un état de demi-contraction permanente dans lequel se trouvent maintenues les fibres musculaires lisses des parois vasculaires. Depuis la découverte par Furchgott et Zawadzki du rôle joué par l'endothélium dans la relaxation des artères isolées en réponse à l'acétylcholine (Furchgott et Zawadzki, 1980), les connaissances sur les CE et leur implication dans le tonus vasculaire n'ont cessé de progresser. Il est aujourd'hui démontré que les cellules endothéliales régulent activement le tonus et la vasomotricité des CML, en répondant aux forces mécaniques et aux médiateurs neuro-humoraux par la libération d'une variété de facteurs relaxants et contractants.

Les facteurs relaxants issus de l'endothélium (EDRF, *Endothelium-derived relaxing factors*) comprennent le NO, la prostacycline PGI_2 et le facteur endothélial hyperpolarisant (EDHF, *Endothelium-derived hyperpolarizing factors*) encore mal décrit (Komori et Vanhoutte, 1990). En effet, la nature biochimique de ce facteur reste controversée et plusieurs EDHF ont été proposés parmi lesquels les acides époxyéicosatriénoïques, métabolites formés à partir de l'acide arachidonique par l'action du cytochrome P450, ou le peroxyde d'hydrogène. Les EDHF stimulent l'ouverture des canaux potassiques en particulier calcium-dépendants des CML, provoquant ainsi leur hyperpolarisation. Dans des conditions physiologiques, la libération de facteurs de relaxation, notamment le NO, prédomine sur celle des facteurs de contraction. Le NO est synthétisé à partir de la L-arginine par la NO synthase (NOS) qui catalyse la transformation de la L-arginine en NO et L-citrulline (Figure 5). L'enzyme NOS existe sous deux formes dans les CE : NOS3 (ou eNOS) exprimée de façon constitutive et iNOS, inductible notamment lors de l'inflammation. L'activité de NOS3 bien que constitutive est également régulée et principalement augmentée par l'élévation du calcium intracellulaire. La contrainte de cisaillement exercée par le sang sur l'endothélium est un stimulus majeur de la libération de NO. D'autres molécules comme les hormones circulantes (catécholamines, vasopressine), les autocoïdes formés dans la paroi vasculaire (bradykinine, histamine), les substances libérées par les plaquettes (sérotonine, ATP, ADP), l'acétylcholine et la thrombine peuvent réguler la synthèse de NO. Ce gaz soluble dans l'eau est une petite molécule lipophile capable de traverser les membranes biologiques. Les effets du NO sont médiés par le GMP cyclique (GMPc) intracellulaire. Il active la guanylate cyclase

cytosolique qui transforme le GTP en GMPc. Le GMPc est un second messager qui par l'intermédiaire de la protéine kinase G (PKG), entraîne une baisse rapide du calcium libre intracellulaire, une diminution de la sensibilité au calcium de l'appareil contractile et ainsi la relaxation du muscle lisse vasculaire. La demi-vie très courte du NO (3 à 5 secondes) limite sa zone d'activité biologique. Cette molécule vasodilatatrice est aussi capable d'inhiber l'adhésion et l'activation des leucocytes et des plaquettes (Figure 5).

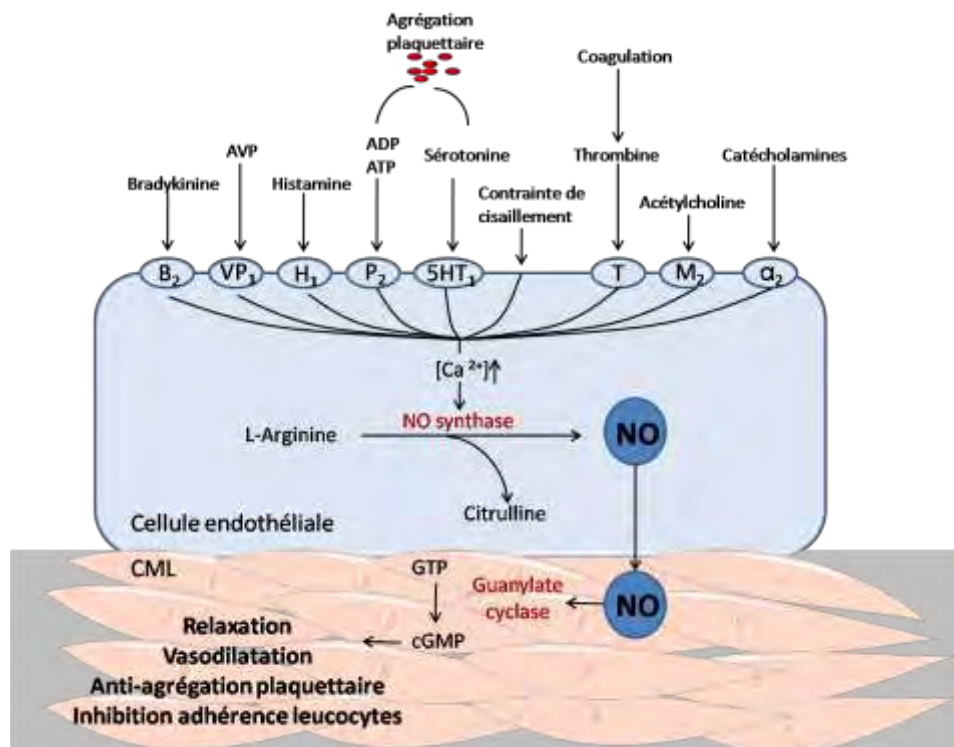


Figure 5. Synthèse et effet du monoxyde d'azote sur le muscle lisse vasculaires. ADP, Adénosine diphosphate ; ATP, Adénosine triphosphate ; AVP, Arginine vasopressine ; CML, cellule musculaire lisse ; GTP, Guanosine triphosphate ; cGMP, cyclique guanosine monophosphate 5HT₁, sérotonine.

D'après (Gewaltig et Kojda, 2002)

Les CE peuvent également produire des facteurs vasoconstricteurs (EDCF, *Endothelium-derived contracting factors*) comme l'angiotensine II, le tromboxane A₂ qui stimule la contraction des CML et l'endothéline (ET1, ET2) qui à forte concentration provoque par stimulation des récepteurs ET_A et ET_B une constriction des CML, principalement consécutive à la stimulation de la phospholipase C et à l'augmentation du calcium intracellulaire. L'ET1 est le plus puissant vasoconstricteur (artériel et veineux) identifié jusqu'à présent, dix fois plus actif que l'angiotensine II *in vitro* (Yanagisawa et al., 1988). Ces EDCF interagissent au niveau des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G des CML et induisent la libération de calcium dans le cytoplasme et l'activation des protéines G de la famille Rho (Loirand et al., 2006). Ces deux voies

d'activation conduisent à la phosphorylation de la chaîne légère de la myosine initiatrice de la contraction cellulaire. Les endoperoxydes et les radicaux libres de l'oxygène qui dégradent le NO (Rubanyi et Vanhoutte, 1986) sont également des facteurs constricteurs formés par l'endothélium et les CML.

4. *L'inflammation*

L'inflammation aiguë est une réponse physiologique et rapide à une infection microbienne ou une lésion tissulaire. Elle induit le recrutement local et l'activation des polynucléaires neutrophiles qui permettent la suppression du stimulus inflammatoire par l'élimination des agents infectieux et des débris cellulaires. Si ce processus est suffisamment efficace, l'inflammation aiguë se résorbe, le tissu retrouve son architecture initiale ou laisse place à une cicatrice de tissu conjonctif. Cependant, si le stimulus n'est pas éliminé le processus inflammatoire perdure et évolue. La composition des leucocytes infiltrant le tissu change : les premières cellules effectrices, les neutrophiles, sont remplacées par un mélange de macrophages, de monocytes et de lymphocytes. C'est ainsi que l'immunité innée laisse place à l'immunité adaptative qui intervient de façon antigène-spécifique grâce aux lymphocytes B et T. Les lymphocytes T activés peuvent accroître les fonctions effectrices des monocytes ou recruter des cellules effectrices alternatives comme les éosinophiles.

Ainsi, les cellules effectrices de l'immunité adaptative, plus spécialisées, parviennent généralement à éliminer les agents infectieux ayant résisté à l'immunité innée, aboutissant à la résolution de l'inflammation et la réparation des tissus. Néanmoins, une stimulation prolongée induite par des microbes résistants ou la présence d'auto-antigènes aboutit à une inflammation chronique accompagnée de la formation de néo-tissus (remodelage vasculaire, structures lymphoïdes ectopiques). Par le passé, les études s'intéressant au processus inflammatoire décrivaient majoritairement le type et le rôle des leucocytes infiltrant les tissus. Cependant, il est désormais clairement démontré que les CE jouent un rôle crucial dans ce processus en participant aux différentes phases de l'inflammation.

Le processus d'inflammation aiguë induit un recrutement rapide -de l'ordre de l'heure- des neutrophiles ainsi que des modifications phénotypiques et fonctionnelles des CE, regroupées sous le terme d'activation endothéliale (Poerber et Cotran, 1990). Le processus d'activation de l'endothélium peut être divisé en deux phases successives. La première est

rapide et se caractérise par la libération de molécules préformées, elle est appelée activation de type 1 ou stimulation. La deuxième intervient plus tardivement car elle nécessite la transcription et la traduction de nouveaux gènes et est nommée activation de type 2. Dans ces deux types d'activation, les CE vont participer à trois des quatre points cardinaux de l'inflammation (chaleur, rougeur, gonflement et douleur). L'augmentation locale du flux sanguin contribue à la rougeur et la chaleur au niveau du site de l'inflammation, la présence d'un liquide séreux riche en protéines (exsudat) participe à l'œdème, le recrutement et l'activation des leucocytes circulants permettent leur entrée dans le tissu infecté ou lésé. L'augmentation du flux sanguin permet l'accumulation des leucocytes au niveau de la lésion, alors que l'exsudat forme une matrice provisoire pour les leucocytes facilitant leur adhésion, leur capture et leur extravasation dans le tissu. La douleur, le quatrième point cardinal indépendant des CE, est due à la libération de médiateurs par les leucocytes au niveau des fibres nerveuses de type C.

a. L'activation endothéliale de type 1

L'activation endothéliale de type 1 est principalement induite par des ligands de récepteurs couplés aux protéines G (RCPG), comme le récepteur de l'histamine H1, couplé à la protéine G hétérotrimérique composée des sous-unités α_q , β et γ (Pober et Cotran, 1990). Ainsi, à l'état basal, la sous-unité α_q lie une molécule de GDP qui est remplacée par une molécule de GTP lors de son activation. Cet échange du GDP par le GTP entraîne la dissociation de la sous-unité α_q du dimère $\beta\gamma$. La sous-unité α_q libre, active alors l'isoforme β de la phospholipase C (PLC β). Cette enzyme membranaire clive le phosphatidyl-inositol-4,5-diphosphate (PIP₂) en inositol-triphosphate (IP₃) et en diacylglycérol (DAG). Ces deux seconds messagers agissent à leur tour comme des effecteurs : l'IP₃, en se liant à des canaux calciques du réticulum endoplasmique (RE), permet d'augmenter la concentration cytoplasmique en calcium, et le DAG, en agissant sur la protéine kinase C (PKC), favorise l'ouverture de canaux calciques membranaires (Figure 6) (Lückhoff et Clapham, 1992).

L'augmentation du flux sanguin résulte de cette accumulation d'ions calciques (Ca²⁺) dans le cytosol. La phospholipase cellulaire A₂ (cPLA₂), activée par la forte concentration en Ca²⁺ cytosolique libre, clive la phosphatidylcholine (PC) en acide arachidonique qui est successivement converti en prostaglandine H₂ par la cyclooxygénase-1 (COX1) puis en PGI₂ par la prostacycline synthase. PGI₂ joue alors son rôle de vasodilatateur et entraîne la

relaxation des CML (Egan et FitzGerald, 2006). Le Ca^{2+} cytosolique forme également un complexe avec la calmoduline qui active l'enzyme NOS3 permettant la production de NO, lui aussi vasodilatateur (Figure 6).

La fuite des protéines plasmatiques du sang vers les tissus nécessite une forte concentration en calcium mais aussi l'activation des Rho GTPase. Lors de l'inflammation, l'activation des RCPG suivie de la formation du dimère $\beta\gamma$, facilite la conversion de GDP en GTP et ainsi l'activation des petites protéines G de la famille Rho (Niu et al., 2003). La formation du complexe Ca^{2+} -calmoduline active la kinase des chaînes légères de la myosine (MLCK, *myosin-light-chain kinase*) (Stevens et al., 2000). Parallèlement, la forme activée Rho-GTP stimule la kinase ROCK qui phosphoryle et inactive la phosphatase des chaînes légères de la myosine (MLC, *myosin-light-chain*), responsable de la déphosphorylation et donc de l'inactivation des MLC (Stevens et al., 2000). Ainsi, la combinaison de l'activation de la MLCK (médiée par le complexe Ca^{2+} -calmoduline) et de l'inhibition de la phosphatase des MLC (médiée par la kinase Rho-dépendante) induit l'augmentation de la phosphorylation des chaînes légères de la myosine. Cette phosphorylation initie la contraction des filaments d'actine reliés aux jonctions serrées et adhérentes, permettant la rétraction des CE et la formation d'interstices entre les cellules. Les protéines plasmatiques passent alors du sang vers le tissu et s'assemblent en une matrice provisoire facilitant l'attachement, la survie et la migration des leucocytes infiltrants (Figure 6) (Frangogiannis, 2006).

L'augmentation du Ca^{2+} cytosolique dans les CE joue également un rôle majeur dans le recrutement des leucocytes. La phosphorylation des MLC initie l'exocytose des corps de Weibel Palade, permettant ainsi le transport et l'exposition de la P-selectine à la surface luminale des CE (McEver et al., 1989). Par ailleurs, la réaction catalysée par la phospholipase cPLA_2 génère le facteur d'activation plaquettaire (PAF, *Platelet activating factor*), qui attire les neutrophiles par chimiotactisme et initie leur extravasation, *via* les intégrines α_4 . La P-sélectine interagit avec les molécules PSGL1 (*P-selectin glycoprotein ligand-1*) et sialyl Lewis X des neutrophiles et entraîne ainsi leur adhésion à l'endothélium. La migration des neutrophiles au niveau des jonctions intercellulaires est également dépendante des molécules d'interaction PECAM1 (*platelet-endothelial cell adhesion molecule 1*, CD31) et CD99 (Schenkel et al., 2002). Il a été démontré que le processus d'extravasation peut aussi se faire à travers les CE (Feng et al., 1998). Cependant, les mécanismes mis en jeu ne sont actuellement pas identifiés (Figure 7).

En résumé, la réponse à l'activation de type 1 résulte d'un ensemble de phénomènes aboutissant à l'élévation du Ca^{2+} cytosolique et à l'activation de la voie Rho (Figure 6).

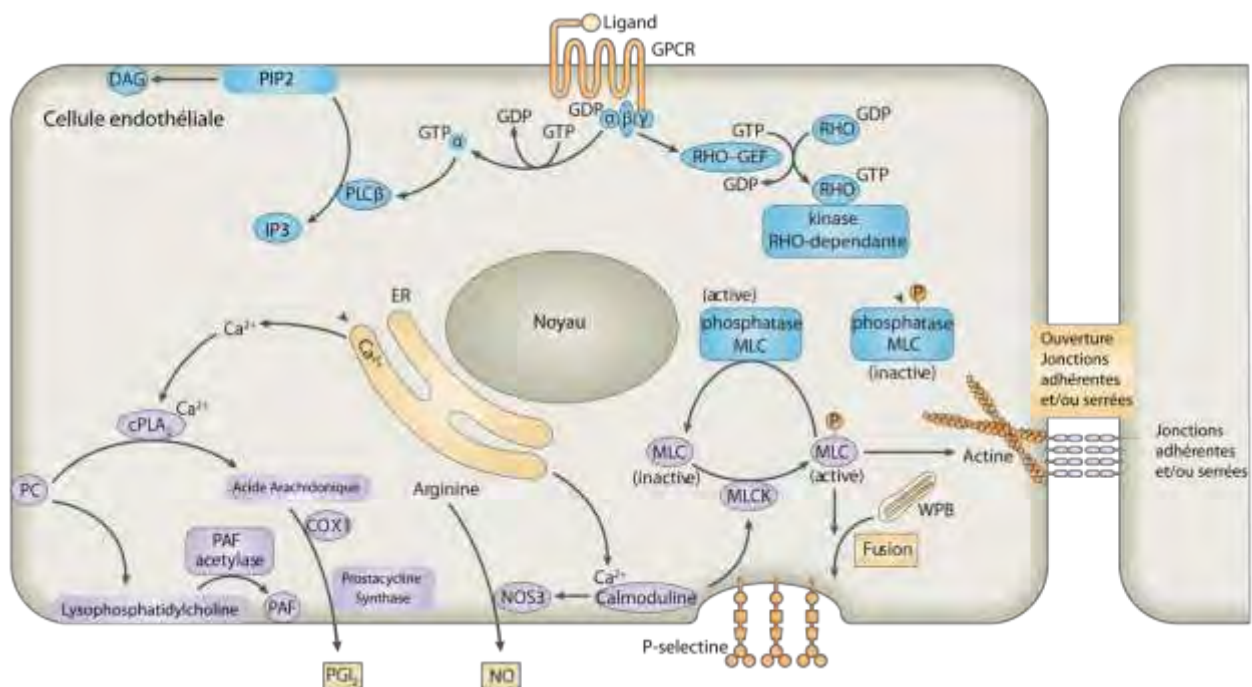


Figure 6. Activation de type 1 au cours de la réponse inflammatoire aiguë des cellules endothéliales
D'après (Pober et Sessa, 2007)

b. L'activation endothéliale de type 2

Les RCPG sont capables de transmettre le signal d'activation durant 10 à 20 minutes. Au-delà, les récepteurs deviennent insensibles afin d'éviter toute nouvelle stimulation qui induirait l'emballement du processus inflammatoire (Feng et al., 1998). Une réponse inflammatoire plus longue nécessite alors une forme d'activation endothéliale plus persistante qui est assurée par l'activation de type 2. Les médiateurs les plus connus et les plus classiques de cette réponse sont le $\text{TNF}\alpha$ et l'interleukine 1 (IL1) sécrétés principalement par les leucocytes activés (Figure 8) (Pober et Cotran, 1990).

Dans les CE, la liaison du $\text{TNF}\alpha$ à son récepteur TNFR-1 entraîne la fixation de la protéine TRADD (*TNFR-1 associated death domain protein*) au domaine cytoplasmique du TNFR-1 par l'interaction des domaines de mort ou *death domain* (DD). TRADD, à son tour, recrute la sérine /thréonine kinase RIP1 (*receptor-interacting protein 1*) et l'ubiquitine ligase TRAF2 (*TNFR-associated factor 2*). Ce complexe initie des cascades impliquant plusieurs kinases dont les phosphorylations aboutissent à l'activation du facteur nucléaire NF κB

(*Nuclear factor kappa b*) et de la protéine activatrice 1 (AP1, *activator protein 1*) (Chen et Goeddel, 2002).

La liaison de l'IL1 à son récepteur de type 1 (IL1R1), quant à elle, induit une voie de signalisation médiée par un complexe comprenant la protéine adaptatrice MyD88 (*myeloid differentiation primary-response gene 88*), la protéine accessoire du récepteur de l'IL1 nommé TIRAP (*Toll/IL1 receptor accessory protein*), les kinases 1 et 4 associées au récepteur de l'IL1 (IRAK1-4, *IL1 receptor associated kinase*) et le facteur TRAF6 (*TNFR-associated factor 6*). La voie de signalisation induite par l'IL1 aboutit à l'activation des mêmes facteurs de transcription que celle du TNF α : NF κ B et AP1 (Martin et Wesche, 2002).

Les réponses pro-inflammatoires induites par ces cytokines engendrent la transcription et la traduction de nouveaux gènes par l'action de NF κ B et d'AP1. Ce phénomène nécessite la mobilisation de la machinerie cellulaire, c'est pourquoi la réponse de type 2 est plus tardive et requiert plusieurs heures pour se mettre en place. Au contraire, l'activation de type 1 est rapide car elle résulte de la libération de molécule préformée, elle permet ainsi une réponse dans les minutes qui suivent la stimulation. Cette hiérarchisation dans le temps assure une action ciblée et efficace des CE.

De même que l'activation de type 1, celle de type 2 permet d'augmenter le flux sanguin, le passage de protéines plasmatiques du sang vers les tissus et le recrutement des leucocytes au niveau du site de l'inflammation. Elle augmente la synthèse de PGI₂ par l'induction de la cyclooxygénase-2 (COX2) qui présente une activité enzymatique plus élevée que COX1. Le transfert de protéines plasmatiques induit par le TNF α et l'IL1 résulte de la réorganisation des cytosquelettes d'actine et de tubuline, qui engendre la rétraction des CE et donc la formation d'espaces entre les cellules (Pober et al., 1987) (Petrache et al., 2003). Les protéines plasmatiques forment une matrice plus dure que celle observée lors de l'activation de type 1. Cette induration est due à la présence de protéines plus grosses comme le fibrinogène. Le recrutement des leucocytes est aussi plus efficace que dans l'activation de type 1 en raison de la synthèse de nouvelles protéines : des chimiokines comme CXCL8 (IL8) et des molécules d'adhésion comme l'E-sélectine. Grâce à la combinaison PAF, CXCL8, E et P sélectines, les leucocytes sont plus efficacement attirés sur le site inflammé et adhèrent plus fermement à l'endothélium activé (Figure 7).

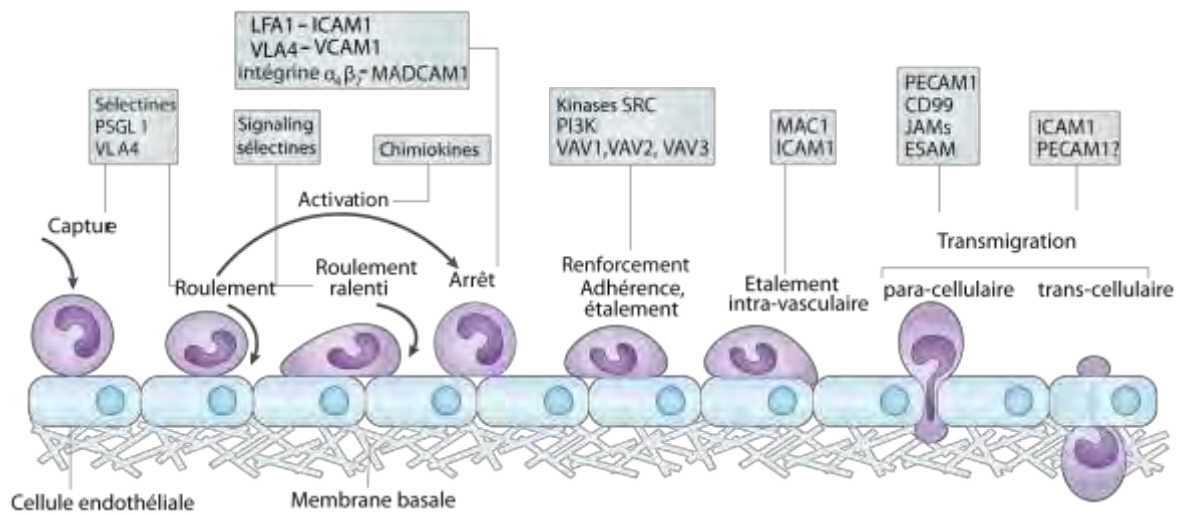


Figure 7. Cascade d'adhérence des leucocytes sur l'endothélium. L'initiation du roulement des leucocytes se fait par l'intermédiaire des sélectines (E et P-sélectines) qui interagissent avec les molécules PSGL1 et d'autres ligands glycosylés. Les intégrines participent également au phénomène de roulement en permettant une adhésion plus ferme à l'endothélium. Ainsi, les molécules ICAM-1, VCAM-1 et MADCAM1 exprimées par l'endothélium se lient respectivement avec les intégrines LFA1 et VLA4 et $\alpha_4\beta_7$ présentes à la surface des leucocytes. Ces interactions permettent l'arrêt des leucocytes, suivi de leur étalement et de leur migration entre ou à travers les cellules endothéliales, notamment grâce aux protéines PECAM1 ou CD99. Les molécules clé de chaque étape sont indiquées dans les cadres. ESAM, *endothelial cell-selective adhesion molecule* ; ICAM1, *intercellular adhesion molecule 1* ; JAM, *junctional adhesion molecule* ; LFA1, *lymphocyte function-associated antigen 1* ; MAC1, *macrophage antigen 1* ; MADCAM1, *mucosal vascular addressin cell adhesion molecule 1* ; PECAM1, *platelet endothelial-cell adhesion molecule 1* ; PI3K, *phosphoinositide 3-kinase* ; VLA4, *very-late antigen 4*.
D'après (Ley et al., 2007)

Une fois initiées, les réponses de l'activation de type 2 vont évoluer dans le temps. La synthèse de l'E-sélectine est spontanément arrêtée, malgré la présence continue des chimiokines. D'autres protéines, qui présentent une cinétique d'activation plus lente, vont prendre le relais avec l'expression de VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule-1*) et ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule-1*). La synthèse de nouvelles chimiokines, comme la CC-chimiokine ligand 2 (CCL2 aussi appelé MCP1), et le changement de molécules d'adhésion favorisent l'infiltration des mononucléaires. Un stimulus long, peut également induire l'apoptose des CE et provoquer une thrombose des vaisseaux altérés. La formation du thrombus est une étape importante de l'inflammation qui permet d'éviter la dissémination de l'infection. Toutefois elle provoque des lésions endothéliales importantes et des hémorragies locales.

L'activation de type 2 persiste jusqu'à la disparition des cytokines inflammatoires. L'élimination du stimulus inflammatoire provient généralement de l'éradication de l'infection ou du processus initial. Cependant, l'expression des protéines induites par l'activation de type 2 peut être réprimée par des mécanismes de rétrocontrôle négatif qui bloquent le processus inflammatoire, comme par exemple l'inactivation du facteur de transcription NF- κ B.

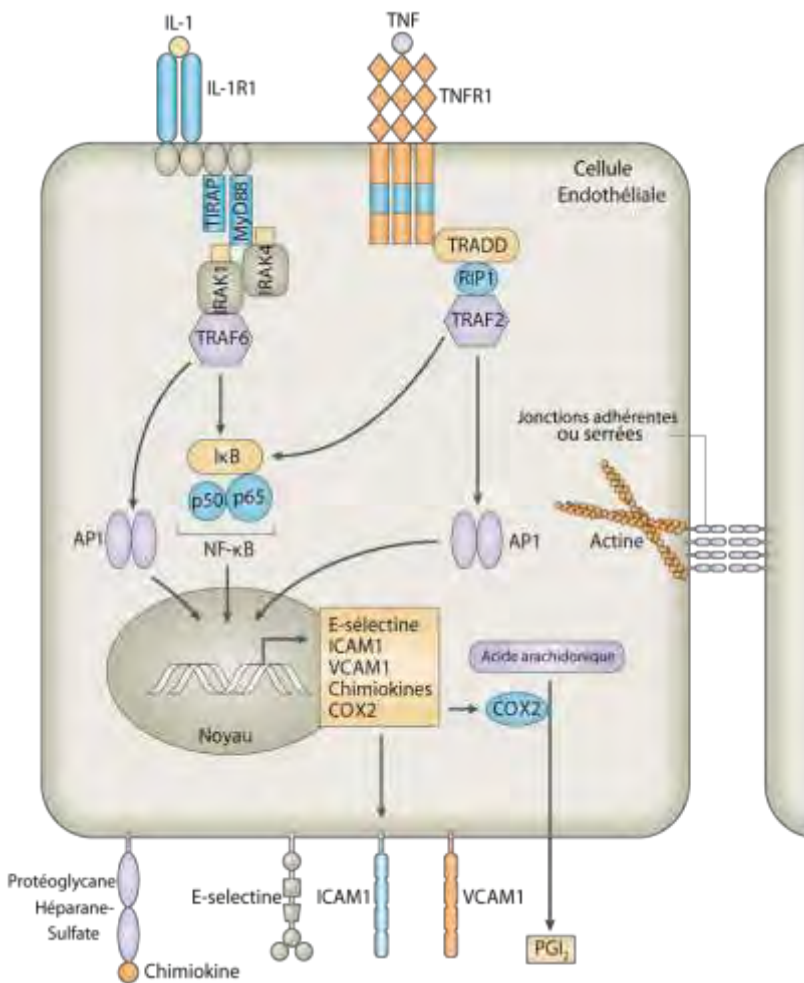


Figure 8. Activation de type 2 au cours de la réponse inflammatoire aiguë des cellules endothéliales
D'après (Pober et Sessa, 2007)

La protéine adaptatrice Lnk (SH2B3)

Les cellules possèdent des mécanismes évolués leur permettant de convertir des stimuli environnementaux en réponses biologiques. Ce phénomène de transmission du signal, initié par des messagers biologiques comme les hormones ou les facteurs de croissance, fait intervenir des récepteurs cellulaires capables de reconnaître le signal initial, mais également des molécules intracellulaires chargées de transmettre et de transformer ce stimulus en une réponse biologique.

La classe de protéines dites « adaptatrices » participe à ces cascades de signaux intracellulaires et contribue à l'élaboration d'une réponse spécifique et adaptée. Ces protéines sont capables de moduler la signalisation intracellulaire en régulant les interactions, constitutives ou inductibles, entre protéines. Pour ce faire, elles possèdent des domaines ou des motifs spécifiques qui leur permettent d'interagir avec leurs cibles protéiques ou lipidiques. Elles régulent ainsi l'assemblage de complexes multimoléculaires essentiels à la transmission des signaux extracellulaires. Bien que dépourvues d'activité enzymatique intrinsèque, elles jouent ainsi un rôle essentiel dans la biologie cellulaire. Le nombre croissant de pathologies associées à des altérations de la fonction des protéines adaptatrices, atteste de leur importance dans la régulation de nombreux processus physiologiques (Sugiura et al., 2006) (Badolato et Parolini, 2007) (Oh et al., 2010a).

I. Les protéines adaptatrices de la famille SH2B

1. Structure générale

Les protéines adaptatrices sont généralement composées de plusieurs domaines d'interaction « protéine-protéine » leur permettant de relier des protéines effectrices et régulatrices. Lnk (aussi appelée SH2B3) appartient à la famille de molécules adaptatrices SH2B (*Src homology 2-B*) contenant SH2B1 (aussi appelée SH2B) et APS (*adapter protein with PH and SH2 domain*, aussi appelée SH2B2). Le transcrit de SH2B1 est soumis à un épissage alternatif en 3' qui aboutit à quatre isoformes SH2B1 α , β , γ et δ (Nelms et al., 1999a) (Yousaf et al., 2001). Ces quatre isoformes possèdent une région N-terminale ainsi que des

domaines PH et SH2 identiques. Ils diffèrent uniquement dans leur région C-terminale qui est plus ou moins longue. Le transcrit de APS, quant à lui, produit deux isoformes SH2B2 α et β (Li et al., 2007). Les protéines de cette famille possèdent une forte homologie de structure, ainsi que plusieurs domaines d'interaction caractéristiques des molécules adaptatrices : un domaine riche en proline en N-terminal, suivi d'un domaine d'homologie à la pleckstrine (PH), puis d'un domaine SH2 (*Src homology 2*) et de tyrosines phosphorylables en C-terminal (Osborne et al., 1995) (Huang et al., 1995) (Yokouchi et al., 1997). Ces protéines possèdent également plusieurs sites riches en proline ainsi qu'un domaine de dimérisation (DD). Ce dernier possède en son centre un motif *phenylalaline zipper* permettant la formation d'homo et/ou d'hétérodimères (Dhe-Paganon et al., 2004) (Nishi et al., 2005). Seule Lnk semble ne pas pouvoir se lier à APS et SH2B pour former des hétérodimères et ne se trouverait donc que sous forme d'homodimère (Figure 9).

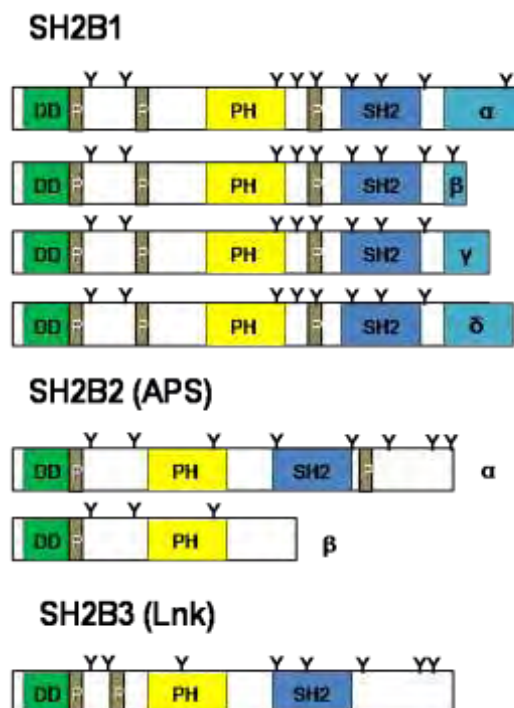


Figure 9. Structure protéique des membres de la famille SH2B. DD, domaine de dimérisation ; P, région riche en proline ; Y, tyrosine. D'après (Maures et al., 2007)

Chaque domaine présente une spécificité d'interaction. Ainsi, le domaine PH se lie aux phospholipides de la membrane, permettant une localisation membranaire des protéines. Le domaine SH2 se lie à des résidus tyrosines phosphorylés et les régions riches en proline sont

reconnues par les domaines SH3. Enfin les tyrosines phosphorylées permettent la liaison avec des protéines possédant un domaine SH2 ou PTB (*phosphotyrosine binding*).

Les membres de cette famille de protéines sont exprimés dans de nombreux tissus, suggérant leur rôle dans diverses voies de signalisation et processus physiologiques. Ils ont notamment été identifiés comme impliqués dans la transduction du signal de plusieurs récepteurs tyrosine kinases comme les récepteurs de l'insuline (Nelms et al., 1999b) (Zhang et al., 2008), de l'IGF-1 (*insulin-like growth factor I*) (Wang et Riedel, 1998), du NGF (*nerve growth factor*) (Qian et al., 1998) (Rui et al., 1999), du BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*) (Qian et al., 1998), du GDNF (*glial cell line-derived neurotrophic factor*) (Zhang et al., 2006), du PDGF (*platelet-derived growth factor*) (Rui et Carter-Su, 1998), et du FGF (*fibroblast growth factor*) (Kong et al., 2002).

2. La protéine SH2B1

La protéine SH2B1 a été identifiée pour la première fois en 1995 par Osbourne *et al.* à partir d'une banque d'ADNc issue de mastocytes de rat. Cette protéine est exprimée de façon ubiquitaire et est majoritairement localisée au niveau de la membrane plasmique (Rui et Carter-Su, 1998). Une étude de Chen *et al.* a cependant montré une localisation nucléaire de la protéine SH2B1 et observé un transport du cytoplasme au noyau, dépendant de Crm-1 (Chen et Carter-Su, 2004).

Durant ces dix dernières années, plusieurs équipes se sont attachées à déterminer les fonctions de SH2B1 notamment en identifiant les partenaires moléculaires de cette protéine. La protéine Janus kinase 2 (JAK2) est une des premières à avoir été caractérisée comme pouvant être liée à SH2B1 (Rui et al., 1997). Cette protéine est une tyrosine kinase associée aux récepteurs des cytokines, elle est impliquée dans plusieurs voies de signalisation responsables principalement de la survie et de la prolifération cellulaire. Des expériences de co-immunoprécipitation dans des préadipocytes, ont montré que l'activation de JAK2 par l'hormone de croissance GH (*growth hormone*) entraîne la liaison de l'isoforme β de SH2B1 avec JAK2, mais aussi la phosphorylation de SH2B1 β au niveau de résidus tyrosine (Rui et al., 1997). Ce résultat suggère que SH2B1 β pourrait être un substrat de JAK2. De plus, SH2B1 β semble indispensable à la transduction du signal induite par la GH et médiée par JAK2. En effet, la protéine SH2B1 β mutée au niveau des Tyr439 et Tyr494, ne

permet par la formation du renflement de la membrane plasmique (ruffling) résultant de la stimulation par l'hormone GH. L'hypothèse proposée est que la phosphorylation de SH2B1 β par JAK2, permettrait le recrutement d'une ou de plusieurs protéines, pour le moment non identifiées, qui lient SH2B1 β au cytosquelette d'actine *via* les Tyr439 et Tyr494 (O'Brien et al., 2003). Il a donc été montré que SH2B1 lie JAK2 par son domaine SH2 et potentialise son activité en réponse à la GH. Deux mécanismes ont été proposés pour expliquer le contrôle de l'activité de JAK2 par SH2B1. Le premier est que la dimérisation de SH2B1 entraînerait la dimérisation de JAK2 ce qui permettrait d'augmenter son activité (Nishi et al., 2005). Le second propose que SH2B1 maintienne JAK2, par son interaction, dans un état actif et augmente ainsi le nombre de molécules JAK2 actives (Kurzer et al., 2006).

D'autres protéines adaptatrices ont été identifiées comme partenaires de SH2B1. Qian *et al.* ont montré que SH2B1 co-immunoprécipite avec la petite molécule adaptatrice Grb2, protéine importante dans la voie de signalisation du NGF dans les neurones (Qian et al., 1998). Ren *et al.* ont décrit l'association de SH2B1 avec une autre protéine adaptatrice, appelée IRS (*insulin receptor substrate*). Cette protéine active notamment JAK2 en réponse à la leptine (Ren et al., 2005). La leptine est une hormone, sécrétée par le tissu adipeux, qui contrôle l'homéostasie énergétique. Elle permet de diminuer le poids en régulant l'appétit par le contrôle de la sensation de satiété, mais aussi en favorisant la dépense énergétique. La leptine se lie à son récepteur LRb dans les neurones de l'hypothalamus, cette liaison active JAK2, qui dans un premier temps, s'associe à LRb, puis phosphoryle différentes molécules impliquées dans la voie de signalisation, dont les protéines IRS et STAT3. Il a été montré que SH2B1 est capable de recruter IRS1 et IRS2 et d'induire la formation d'un complexe tertiaire composé de JAK2, SH2B1, IRS1 et IRS2. C'est ainsi que SH2B1 induit la phosphorylation des protéines IRS qui, à leur tour, activent la voie de la PI3K. SH2B1 contrôle ainsi l'activation de la PI3K induite par la leptine en recrutant les protéines IRS (White, 1998). La génération de souris KO (*Knock-out*) pour le locus *SH2B1* (SH2B1^{-/-}) a révélé plusieurs fonctions physiologiques de cette molécule et a confirmé son rôle d'activateur de JAK2. Un des phénotypes les plus notables est le développement d'une sévère obésité et d'une hyperphagie chez les souris SH2B1^{-/-} (Ren et al., 2005). Ces souris sont deux fois plus lourdes que les souris wild-type (WT) 21 jours après leur naissance. En accord avec le rôle de SH2B1 dans l'activation de la voie de la leptine, l'obésité des souris SH2B1^{-/-} s'accompagne d'une résistance à la leptine. De même, SH2B1 a été montrée comme étant un régulateur de la

voie de signalisation de l'insuline (Kotani et al., 1998). En se liant directement avec IRS1 et IRS2, SH2B1 augmente la sensibilité des récepteurs à l'insuline en amplifiant leur activité catalytique et en inhibant la déphosphorylation des protéines IRS (Morris et al., 2009) (Morris et al., 2010). SH2B1 se lie également au récepteur de l'IGF-1 (Wang et Riedel, 1998). Ainsi, l'ensemble de ces résultats suggère un rôle majeur de SH2B1 dans la régulation de l'homéostasie énergétique.

Un autre rôle potentiel de la protéine SH2B1 est sa participation à l'organisation du cytosquelette : d'un côté par son implication dans la formation de renflement membranaire induite par la GH et médiée par JAK2, de l'autre par sa capacité à lier la protéine Rac (Diakonova et al., 2002) par l'intermédiaire de son domaine riche en proline situé en N-terminal. Rac est une protéine majeure dans la régulation de l'actine, impliquée dans la formation des lamellipodes et la migration cellulaire. Or SH2B1 β endogène est présente dans les lamellipodes et les filopodes (Diakonova et al., 2002). De plus, il a été récemment montré que SH2B1 β possède deux sites de liaison à l'actine et que cette protéine peut se lier aux filaments d'actine *in vitro* (Rider et al., 2009). L'ensemble de ces résultats suggère donc un rôle pour SH2B1 β dans la régulation du cytosquelette d'actine par une interaction directe avec l'actine ou par sa liaison avec des protéines intermédiaires.

3. La protéine APS (SH2B2)

La protéine APS a été isolée pour la première fois dans une banque d'ADNc issue de lymphocytes B par la technique de double hybride (Yokouchi et al., 1997). Cette technique a mis en évidence l'association d'APS avec le récepteur tyrosine kinase c-Kit. Par la suite, il a été montré qu'APS s'associe puis est phosphorylé par un grand nombre de récepteurs tyrosine kinase comme le récepteur β du PDGF (Yokouchi et al., 1999), le récepteur de l'érythropoïétine (Wakioka et al., 1999), le récepteur du NGF (TrkA) (Qian et al., 1998) ou celui de l'insuline (Ahmed et Pillay, 2003). La phosphorylation d'APS permet ensuite son interaction avec d'autres protéines comme la protéine adaptatrice Grb2 ou la protéine Cbl. A l'exception du récepteur de l'insuline, la protéine APS régule négativement les voies de signalisation dans lesquelles elle intervient. Elle induit par exemple la dégradation du récepteur du PDGF par l'intermédiaire de Cbl qui agit comme une ubiquitine ligase (Yokouchi

et al., 1999). APS est exprimée dans un grand nombre de tissus tels que la rate, la prostate, les testicules, l'utérus, l'intestin grêle, les muscles squelettiques ou le tissu adipeux.

Le rôle d'APS en tant que régulateur positif dans la voie de signalisation de l'insuline reste controversé. Dans un premier temps, il a été montré qu'APS, comme SH2B1, lie *via* son domaine SH2, la protéine JAK2 ainsi que le récepteur de l'insuline et augmente l'activation de ces deux tyrosine kinases (O'Brien et al., 2002). Le récepteur de l'insuline phosphoryle APS qui se lie alors à c-Cbl. APS est indispensable à la phosphorylation de c-Cbl par le récepteur de l'insuline et l'activation de la voie c-Cbl/CAP/TC10 (Liu et al., 2003) (Ahn et al., 2004). Cette voie a été décrite comme étant primordiale dans la translocation du transporteur de glucose Glut 4 à la membrane et l'entrée de glucose dans les adipocytes (Liu et al., 2002). Ces résultats sont donc en faveur d'une régulation positive d'APS de la sensibilité à l'insuline et la leptine.

D'un autre côté, APS en recrutant c-Cbl, favorise l'ubiquitination et la dégradation du récepteur de l'insuline (Ahmed et al., 2000). En accord avec cette idée, Minami *et al.* ont montré que la délétion du gène *APS* augmente la sensibilité à l'insuline chez des jeunes souris (8-11 semaines) (Minami et al., 2003). Au contraire des premiers résultats, ces études suggèrent donc un rôle de régulateur négatif d'APS dans la régulation de la sensibilité à l'insuline.

Cependant, une étude récente réalisée par Li *et al.*, a montré que la délétion d'*APS* n'altérerait ni l'alimentation, ni la dépense énergétique, ni le poids, ni l'adiposité, ni le niveau de leptine dans le sérum des souris *APS*^{-/-} contrairement à des souris *SH2B1*^{-/-} (Li et al., 2006). Ces observations indiquent qu'APS ne jouerait pas de rôle important dans la régulation de l'homéostasie énergétique. De plus, contrairement à Minami *et al.*, cette étude n'a pas mis en évidence une augmentation de la sensibilité à l'insuline. Il est toutefois à noter que Li *et al.* ont montré que le niveau de leptine et d'insuline est plus bas chez des souris doublement KO (*APS*^{-/-} / *SH2B1*^{-/-}) que chez des souris *SH2B1*^{-/-}. Ce résultat suggère qu'APS pourrait moduler négativement la sensibilité à l'insuline et/ou à la leptine mais uniquement dans certaines conditions, incluant l'absence d'expression de SH2B1 (Li et al., 2006).

La stimulation des lymphocytes B par leur récepteur BCR (*B-cell antigen receptor*) permet la phosphorylation de résidus tyrosine d'un grand nombre de protéines. L'activation de ces protéines entraîne, par la suite, une cascade de modifications biochimiques initiant la

prolifération, la différenciation ou l'inhibition du développement des lymphocytes B. APS a été identifiée comme étant l'une de ces protéines. En effet, la protéine APS est phosphorylée au niveau de ses tyrosines suite à l'activation du BCR (Yokouchi et al., 1997) (Moodie et al., 1999). Les souris transgéniques surexprimant APS (APS-Tg) présentent un nombre réduit de lymphocytes B-1 péritonéaux et de lymphocytes B spléniques. De plus, la transition du stade grande cellule pré-B au stade petite cellule pré-B, dépendant du récepteur pré-BCR, est diminuée, tout comme la prolifération des lymphocytes B matures, induite par l'activation du BCR. APS joue donc le rôle de régulateur négatif de la voie de signalisation des récepteurs pré-BCR et BCR (Iseki et al., 2005). Le mécanisme par lequel APS inhibe l'activation de ces récepteurs n'est actuellement pas connu. Une des hypothèses avancées serait qu'APS modifierait le cytosquelette d'actine, et ainsi régulerait la transduction du signal induisant la prolifération et l'apoptose des lymphocytes B. En effet, plusieurs éléments laissent penser qu'APS joue un rôle dans l'organisation de l'actine. Il a été observé qu'en l'absence d'APS, le nombre de cellules B-1 augmente alors que le nombre de filaments d'actine (F-actine) présents dans ces cellules diminue (Iseki et al., 2004). De plus, les mastocytes présents dans la moelle osseuse de souris KO pour le locus *APS* présentent également une diminution de la F-actine (Kubo-Akashi et al., 2004). Inversement, la F-actine des cellules des souris APS-Tg est augmentée et APS co-localise avec le complexe BCR et l'actine (Iseki et al., 2004). Il apparaît donc possible que la protéine APS régule la voie de signalisation induite par le BCR en contrôlant la réorganisation de l'actine.

D'autres études confirment le rôle de cette protéine dans la régulation du cytosquelette d'actine. En effet, il a été montré qu'APS lie Vav3, un facteur d'échange de nucléotides guanyliques pour Rac et d'autres GTPases de la famille de Rho (Yabana et Shibuya, 2002). Il a également été montré que le domaine N-terminal d'APS s'associe à la protéine Enigma et que l'insuline favorise la formation de ce complexe (Barrès et al., 2005). Enigma est une protéine possédant des domaines PDZ et LIM, elle est décrite comme s'associant avec l'actine. Le complexe Enigma-APS est localisé dans les renflements membranaires d'actine (ruffle) et participe à la translocation du transporteur de glucose Glut 4, induite par l'insuline, en régulant le remodelage de l'actine corticale dans les adipocytes (Barrès et al., 2006).

Les protéines SH2B1 et APS présentent une grande homologie de structure et semblent impliquées dans des voies de signalisation communes comme celles de l'insuline,

de la leptine ou dans la régulation de l'actine. Même si elles peuvent avoir des partenaires moléculaires communs tels que JAK2, leurs actions sont parfois opposées comme dans la voie de l'insuline où SH2B1 joue un rôle de régulateur positif alors que les récentes études montrent un rôle de régulateur négatif pour APS. Cependant, l'activité de ces deux protéines semble liée et il est à envisager qu'une régulation commune et/ou interdépendante existe. En effet, l'isoforme β d'APS, noté SH2B2 β , semble être un inhibiteur endogène de SH2B1 et/ou de SH2B2 α . Une étude a montré que SH2B2 β diminue la capacité de SH2B1 à promouvoir l'activation de JAK2. De plus, SH2B2 β inhibe de façon significative la voie de signalisation induite par l'insuline ainsi que la phosphorylation d'IRS-1 *in vitro* (Li et al., 2007). L'examen d'animaux simples ou doubles KO (APS^{-/-} / SH2B1^{-/-}) devrait permettre de confirmer et de mieux comprendre ces mécanismes.

II. Les fonctions de Lnk dans les cellules d'origine hématopoïétique

La protéine Lnk, comme les autres membres de la famille SH2B, joue un rôle dans la régulation d'hormones et de cytokines. Cette protéine est majoritairement exprimée dans les organes lymphoïdes secondaires (rate, ganglions) mais son expression, bien que plus faible, est également détectée dans l'intestin grêle, les poumons, le cerveau, les testicules et le cœur chez le rat. Chez l'homme, le gène codant pour la protéine Lnk est située sur le chromosome 12 au niveau du locus q24. Lnk humain est une protéine de 575 acides aminés et de poids apparent en SDS-PAGE de 68 kDa. Plusieurs analyses génétiques ont révélé l'existence de variants de Lnk et des études d'association de loci ont montré qu'un polymorphisme de Lnk (rs653178) était associé à de nombreuses pathologies : des maladies auto-immunes telles que le lupus érythémateux systémique (Gateva et al., 2009), la maladie cœliaque (Amundsen et al., 2010) (Hunt et al., 2008), l'asthme (Gudbjartsson et al., 2009), le diabète de type 1 (Cooper et al., 2009) ou la sclérose en plaque (Alcina et al., 2010) mais aussi l'hypertension artérielle (Newton-Cheh et al., 2009) (Levy et al., 2009) ou l'infarctus du myocarde (Gudbjartsson et al., 2009). Les fonctions de Lnk sont principalement décrites dans les cellules d'origine hématopoïétique comme les HSC, les lymphocytes B et T, et les plaquettes. La protéine Lnk a été pour la première fois décrite et caractérisée dans les

lymphocytes T, c'est pourquoi le rôle de Lnk dans les lymphocytes, sera le premier à être abordé dans ce travail.

1. Rôles de Lnk dans les cellules lymphoïdes

a. Les lymphocytes T

La protéine Lnk a été pour la première fois mise en évidence par la technique de double hybride réalisée à partir d'une banque d'ADNc issue de ganglions de rat (Huang et al., 1995). Dans cette étude, Huang *et al.* ont montré que Lnk est phosphorylée au niveau de ses résidus tyrosine suite à l'activation du récepteur des lymphocytes T (TCR). La stimulation du TCR conduit à l'activation d'un grand nombre de voies de signalisation, initiée notamment par la phospholipase $C_{\gamma 1}$, la PI3K et Grb2. Des protéines adaptatrices telles que Vav ou Shc permettent de faire le lien entre le TCR et les voies de signalisation. Par immunoprécipitation, Lnk a été identifiée comme se liant aux protéines phospholipase $C_{\gamma 1}$, PI3K et Grb2 après l'activation du TCR, suggérant un rôle de Lnk dans la transduction du signal induit par le TCR.

Ultérieurement, ce résultat a été confirmé chez l'homme après le clonage de la protéine humaine et sa caractérisation par Li *et al.* (Li et al., 2000). Cette étude a montré que dans les lymphocytes T (LT) *in vitro*, Lnk peut être phosphorylé par la protéine tyrosine kinase $p56^{lck}$, protéine de la famille Src activée par le TCR et impliquée dans la transduction du signal induit par le TCR. Lnk phosphorylée s'associe ensuite à la chaîne ζ du TCR par son domaine SH2. Ces travaux ont également montré que Lnk inhibe l'activation du facteur de transcription NF-AT (*nuclear factor for activated T cell*) induite par le TCR par un mécanisme actuellement non identifié. Lnk semble donc jouer le rôle d'inhibiteur de l'activation des lymphocytes T, en participant à la régulation du signal induit par le TCR (Levy et al., 2009).

L'étude de souris $Lnk^{-/-}$ par Takaki *et al.* n'a pas montré de différence dans le développement et le nombre de lymphocytes T (LT) en comparaison à des souris WT (Takaki et al., 2000). Cependant, la génération de souris transgéniques pour Lnk, a montré que la surexpression de Lnk dans le thymus bloque le développement des précurseurs des LT (pro-LT) et entraîne une diminution du nombre de LT en périphérie, suggérant une action inhibitrice de la lymphopoïèse (Takaki et al., 2003).

b. Les lymphocytes B

Le développement des lymphocytes B (LB) comporte une série d'étapes de différenciation. Initiée par la cellule souche hématopoïétique, elles conduisent au lymphocyte B immature (B220^{lo} IgM^{hi}), en passant par le stade pré pro-B, puis pro-B et enfin pré-B (B220^{lo} IgM⁺). Le laboratoire de Perlmutter a été le premier à générer des souris Lnk^{-/-} (Takaki et al., 2000). Si aucune différence n'a été observée dans la population des LT, une accumulation splénique importante des précurseurs des LB a été remarquée chez ces animaux. De plus, le nombre de cellules pro-B et pré-B est augmenté de façon importante dans la moelle osseuse des souris Lnk^{-/-}, tout comme le nombre de lymphocytes B. A l'état basal, Lnk semble donc capable de restreindre l'expansion de la population des précurseurs des LB durant la lymphopoïèse (Takaki et al., 2000). La différenciation des LB est régulée par des facteurs de croissance. Les auteurs ont donc cherché le récepteur de facteur de croissance dont la fonction serait altérée par l'absence de Lnk. Ainsi Takaki *et al.* ont démontré que les précurseurs des LB Lnk^{-/-} sont plus sensibles au SCF que des précurseurs issus de souris WT. En effet, le nombre et la taille des colonies, induites par la stimulation au SCF, sont augmentés chez les cellules issues de la moelle osseuse de souris Lnk^{-/-} comparées au WT. Le facteur de croissance SCF a pour récepteur c-kit, point de départ de la voie de signalisation dans les cellules. Comme APS, Lnk est phosphorylée et s'associe à c-kit (Takaki et al., 2002). Même si la démonstration n'a pas été faite que le SCF est le facteur principal responsable du phénotype observé *in vivo*, ces expériences *in vitro* désignent Lnk comme un régulateur négatif du récepteur c-kit, responsable de la prolifération des précurseurs des LB (Takaki et al., 2000).

Afin de mieux caractériser le rôle de Lnk dans la lymphopoïèse, cette même équipe a généré des souris transgéniques pour Lnk (Takaki et al., 2003). Au contraire du KO, la surexpression de Lnk entraîne une diminution de l'expansion des précurseurs des LB. Le taux de cellules pro-B dans la moelle osseuse diminue proportionnellement à l'expression de Lnk. La surexpression de Lnk a également des conséquences sur les lymphocytes périphériques : dans la rate, le nombre total de cellules B est diminué et la sous population de lymphocytes B immatures T1 (*transitional T1*) ne prolifère plus, avec un blocage en phase G0-G1 de leur cycle cellulaire (Takaki et al., 2003). Ainsi, la surexpression de Lnk dans les cellules B spléniques empêche la maturation et la prolifération des LB.

L'ensemble de ces résultats démontre que Lnk est un régulateur négatif de la lymphopoïèse. La surexpression de Lnk dans les précurseurs lymphocytaires entraîne la diminution du nombre de cellules B et T. L'expansion des précurseurs pro-B dans la moelle osseuse, et des pro-T dans le thymus, est diminuée lors de la surexpression de Lnk. Au contraire, les souris Lnk^{-/-} présentent une surproduction de cellules B en raison d'une hypersensibilité des précurseurs au SCF. Étonnamment, aucune différence dans le développement des LT ou dans leur expansion dans le thymus n'a été observée chez ces souris Lnk^{-/-}. Les cellules B expriment plus fortement Lnk que les cellules T (Takaki et al., 1997). La différence d'expression endogène peut être à l'origine des différences observées entre les cellules B et T. Lnk pourrait agir dans ces deux types cellulaires, mais les cellules B, qui expriment plus fortement la protéine, seraient contrôlées de façon plus stringente par Lnk. Il est aussi possible que les autres protéines de la famille SH2B, SH2B1 ou APS, compensent l'absence de Lnk. Cependant, APS n'est pas exprimée par la lignée des T, et SH2B1 est connue pour son rôle d'activateur des récepteurs ou des voies de signalisation alors que Lnk est clairement montrée comme un inhibiteur de la lymphopoïèse. La génération de souris double KO Lnk^{-/-} / SH2B1^{-/-} pourrait permettre de mieux comprendre les mécanismes de régulation mis en jeu.

2. Rôles de Lnk dans les HSC et les progéniteurs hématopoïétiques

Au vu des premiers résultats montrant une activité spécifique de Lnk dans les lymphocytes, plusieurs équipes se sont intéressées au rôle de cette protéine dans les autres cellules d'origine hématopoïétique, notamment dans les HSC et les progéniteurs. Il a été observé que les souris KO pour Lnk (Lnk^{-/-}) présentent une splénomégalie en raison d'une augmentation importante des précurseurs des lymphocytes B mais aussi des progéniteurs hématopoïétiques ainsi que des HSC (Takaki et al., 2002) (Velazquez et al., 2002).

De plus, la capacité de prolifération *in vitro* des progéniteurs hématopoïétiques $Lnk^{-/-}$ est fortement augmentée, en raison d'une hypersensibilité à plusieurs cytokines comme le SCF, l'IL-3 ou l'IL-7 (Velazquez et al., 2002). En accord avec ces résultats, Lnk est fortement exprimée dans les cellules multipotentes ainsi que dans les précurseurs de la lignée hématopoïétique, suggérant un rôle important pour Lnk dans l'hématopoïèse (Takaki et al., 2002).

Rates de souris

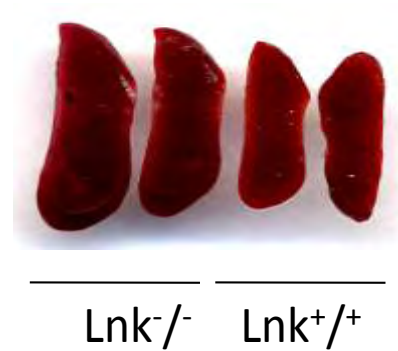


Figure 10. Splénomégalie des souris $Lnk^{-/-}$

Takaki *et al.* ont montré que Lnk est phosphorylée et s'associe à c-kit, le récepteur du SCF (Takaki et al., 2002). Comme d'autres récepteurs tyrosine kinases, la stimulation de c-kit par la fixation de SCF entraîne la dimérisation, la phosphorylation et le recrutement de nombreuses protéines tyrosine phosphorylées, comme la PI3K et PKB/Akt, qui protègent les cellules de l'apoptose, et Gab2 qui conduit à l'activation de la voie des MAP kinases (MAPK, *Mitogen-activated protein kinase*) (Linnekin, 1999). Par son interaction, Lnk inhibe spécifiquement la prolifération induite par c-kit, en atténuant la phosphorylation de Gab2 et l'activation de la voie des p42-44 MAPK (ERK1/2) (Takaki et al., 2002).

Lnk semble également impliqué dans les voies de signalisation d'autres régulateurs des HSC. Il a été montré que Lnk régule négativement le renouvellement des HSC en inhibant le signal induit par la thrombopoïétine (Tpo). Les HSC $Lnk^{-/-}$ montrent une hypersensibilité à la Tpo, accompagnée d'une augmentation de l'activation par phosphorylation d'Akt et de STAT5 et d'une diminution de la phosphorylation de p38 MAPK (Seita et al., 2007). Kato *et al.* ont montré que l'activation continue de STAT5 est un élément majeur dans le développement de maladies myéloprolifératives dues à une augmentation du nombre des HSC (Kato et al., 2005). Akt est connu pour faciliter la progression du cycle cellulaire et la suppression de l'apoptose (Alvarez et al., 2001). Quant à la voie p38 MAPK, elle participe également au contrôle du cycle cellulaire et en serait un régulateur négatif (Bulavin et al., 2004). L'ensemble de ces modifications, résultant de l'absence de Lnk, favoriserait donc le potentiel d'auto-renouvellement des HSC.

Lnk, comme l'ensemble des membres de la famille SH2B, est phosphorylée et se lie à JAK2. Dans les HSC, la protéine Lnk est un inhibiteur de l'activation de JAK2 suite à une

stimulation par la Tpo. En effet, les HSC Lnk^{-/-} présentent une plus forte activation de JAK2 en réponse à une stimulation à la Tpo, comparé à des HSC WT (Bersenev et al., 2008). JAK2 est également impliqué dans la voie de signalisation de l'érythropoïétine (Epo), le principal régulateur du développement des cellules sanguines. Chez les souris déficientes en Lnk, les progéniteurs érythroïdes sont hypersensibles à l'Epo, confirmant le rôle inhibiteur de Lnk dans l'activation de JAK2 et ainsi du récepteur de l'Epo (EpoR). Comme dans la voie de signalisation de la Tpo, Lnk bloque 3 voies majeures activées par l'Epo : STAT5, Akt et les MAPK.

La mutation de JAK2 (JAK2V617F), fréquemment retrouvée chez des patients présentant des syndromes myéloprolifératifs, transforme les cellules hématopoïétiques dont la prolifération devient anarchique car indépendante des cytokines. Lnk se lie à JAK2 mais également à JAK2V617F et régule négativement l'activité des deux protéines. Il a été démontré *in vitro* que l'expression ectopique de Lnk inhibe la prolifération de cellules hématopoïétiques exprimant JAK2V617F. De plus, Lnk inhibe *in vitro* l'expansion clonogénique, l'hypersensibilité aux cytokines et donc la transformation des cellules myéloïdes primaires (Gery et al., 2009). Au contraire, l'absence de Lnk accélère et exacerbe le développement du syndrome myéloprolifératif chez la souris, en ne limitant plus la multiplication des progéniteurs hématopoïétiques et des HSC, par son action sur JAK2 (Bersenev et al., 2010). Paradoxalement, le niveau d'expression de Lnk est plus élevé chez les patients présentant un syndrome myéloprolifératif (Gery et al., 2007) (Gery et al., 2009). Gery *et al.* suggèrent la participation de Lnk à une boucle de rétrocontrôle négatif : l'expression de Lnk serait induite par JAK2 activé et en retour inhiberait la voie de JAK2 (Gery et al., 2009). De même, une mutation du récepteur de la Tpo, nommé MPLW515L/K, a été décrite chez des patients présentant des syndromes myéloprolifératifs et semble être régulée négativement par Lnk (Gery et al., 2007). Enfin, une étude récente a répertorié chez deux patients présentant la mutation JAK2V617F et atteints de syndrome myéloprolifératif, une mutation de Lnk. Ces mutations, différentes chez les patients, participent toutes deux à la dérégulation de la voie JAK-STAT (Oh et al., 2010b).

Ainsi, Lnk contrôle l'expansion des progéniteurs hématopoïétiques à un stade précoce, et pourrait être une cible intéressante pour l'amplification de HSC ou de progéniteurs dans le but de traiter des pathologies hématologiques, notamment par transplantation de moelle

osseuse. En effet, non seulement les HSC $\text{Lnk}^{-/-}$ ont la capacité de proliférer très rapidement, mais encore, comme l'ont montré Takizawa *et al.*, ces cellules s'implantent plus facilement et permettent la reconstitution complète du compartiment lymphoïde de souris immunodéficientes (Takizawa *et al.*, 2006). Cependant, l'action antiproliférative de Lnk pourrait être indispensable au développement non pathologique des HSC et la suppression de cette molécule régulatrice pourrait s'avérer délétère.

3. Rôles de Lnk dans les cellules myéloïdes

a. Les mastocytes

Comme précédemment décrit, Lnk est connue pour son rôle d'inhibiteur de la voie de signalisation du SCF. Cependant, les mécanismes moléculaires mis en jeu ne sont actuellement pas définis. L'étude récente de l'équipe de Velazquez a montré que dans les mastocytes, Lnk se lie directement et préférentiellement au résidu tyrosine 567 du récepteur c-kit par l'intermédiaire de son domaine SH2 (Simon *et al.*, 2008). L'utilisation de mastocytes, issus de la moelle osseuse de souris $\text{Lnk}^{-/-}$, a montré que Lnk diminue la prolifération des mastocytes induite par le SCF, en diminuant l'activité des voies de signalisation des MAPK et de c-jun. De plus, on observe une augmentation importante de la migration des mastocytes $\text{Lnk}^{-/-}$, par chimiotaxie induite par le SCF, démontrant un nouveau rôle pour Lnk, celui d'inhibiteur de la migration. Cette régulation semble être liée à la voie p38 MAPK ainsi qu'à l'activité de Rac. Ces résultats démontrent donc que Lnk, par son interaction avec le récepteur c-kit, inhibe spécifiquement les voies de signalisation du SCF impliquées dans la migration et la prolifération des mastocytes.

b. Les mégacaryocytes et les plaquettes

Outre l'accumulation importante de cellules B immatures, les souris $\text{Lnk}^{-/-}$ présentent une thrombocytose (cinq fois plus de plaquettes circulantes). Le nombre de précurseurs mégacaryocytiques est significativement augmenté dans la rate des souris $\text{Lnk}^{-/-}$, et la taille des colonies dérivées de ces progéniteurs est également plus importante (Velazquez *et al.*, 2002b). Ces résultats indiquent que les cellules progénitrices des souris $\text{Lnk}^{-/-}$ sont hypersensibles aux facteurs de croissance impliqués dans leur expansion. La Tpo est une cytokine primordiale dans le développement des mégacaryocytes et la production plaquettaire. Elle active, par son récepteur c-mpl, différentes voies et activateurs de

transcription comme STAT3, STAT5, PI3K, et p42-44 MAPK. Il a été montré que Lnk bloque le développement des mégacaryocytes induit par la Tpo, en réduisant la taille et la ploïdie de ces cellules *in vitro*. De plus, les mégacaryocytes Lnk^{-/-} issus de la moelle ou de la rate, montrent une plus grande sensibilité à la Tpo, avec une induction prolongée de STAT3, STAT5, PI3K, et p42-44 MAPK. Au contraire, la surexpression de Lnk atténue l'activation de STAT5 et de p42-44 MAPK normalement observée après stimulation. Enfin, le domaine SH2 est essentiel aux fonctions régulatrices de Lnk alors que les tyrosines situées en C-terminal semblent être inutiles. Le domaine SH2, quant à lui, contribue mais n'est pas indispensable à l'inhibition du développement des mégacaryocytes (Tong et al., 2005). Ainsi, Lnk régule négativement la voie de signalisation du récepteur mpl et joue un rôle important dans la mégacaryocytopoïèse médiée par la Tpo *in vivo*.

Lnk semble également contribuer à la maturation des mégacaryocytes *via* une régulation des signaux médiés par les cytokines, mais aussi par les intégrines. Dans la moelle osseuse, les mégacaryocytes sont en contact avec la face basale de l'endothélium. Dans cette position, ces cellules émettent de longs pseudopodes appelés proplaquettes, qui traversent la barrière endothéliale et donneront par la suite naissance aux plaquettes (Tavassoli et Aoki, 1989) (Radley et Haller, 1982). Une étape critique de la thrombopoïèse est la migration des mégacaryocytes et leur adhésion aux cellules endothéliales. Ce processus est régulé par un grand nombre de chimiokines et de cytokines mais aussi par des interactions avec des molécules d'adhérence (VCAM-1) et des protéines de la MEC, comme le collagène. Toutefois, le mécanisme exact régulant la libération des plaquettes par les mégacaryocytes reste méconnu. Il a été montré que les mégacaryocytes issus de souris WT présentent une diminution de la phosphorylation de STAT5 et de p42-44 MAPK induite par la Tpo lorsqu'ils interagissent avec VCAM-1. En revanche, les mégacaryocytes Lnk^{-/-} ne sont pas sensibles à l'interaction avec VCAM-1, et ne présentent pas de diminution de la phosphorylation des voies dépendantes de la Tpo. De plus, la présence de VCAM-1 dans la culture accélère la libération de plaquettes par les mégacaryocytes matures WT, alors que cette molécule d'adhésion est sans effet sur les mégacaryocytes Lnk^{-/-} (Takizawa et al., 2008). Ces résultats suggèrent que le contact entre la molécule d'adhésion VCAM-1 des CE et l'intégrine VLA4 des mégacaryocytes, pourrait contribuer à la libération de plaquettes, et serait sous le contrôle de Lnk.

Une autre fonction surprenante de Lnk est sa capacité à stabiliser la formation du thrombus *in vivo*. La nature des événements cellulaires permettant la formation du thrombus plaquettaire reste peu connue en raison de la difficulté de l'analyse *in vivo* de ce processus. Lorsqu'elles sont activées, les plaquettes sécrètent des médiateurs solubles qui permettent le recrutement de nouvelles plaquettes, leur agrégation et la formation du thrombus. L'activation plaquettaire est induite par plusieurs voies de signalisation dont celle de l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ (Shattil et Newman, 2004), qui conduit à sa liaison avec le fibrinogène ou le vWF. Plusieurs protéines kinases ou adaptatrices sont connues pour participer à l'assemblage du complexe de signalisation de l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ comme Syk, c-Src, Fyn ou Fyb. Ces interactions induisent la modification du cytosquelette et permettent l'étalement (*spreading*) et la stabilisation du thrombus plaquettaire : ce processus est nommé *outside-in signaling*. Par une technique d'imagerie intravitale, Takizawa *et al.* ont observé la formation de thrombus chez des souris WT et $\text{Lnk}^{-/-}$ (Takizawa *et al.*, 2010). Ils ont ainsi constaté que les plaquettes $\text{Lnk}^{-/-}$ s'étaient moins sur le fibrinogène et forment plus difficilement un caillot sanguin que les plaquettes WT. De plus, la phosphorylation de la sous-unité de l'intégrine β3 est diminuée, ainsi que la liaison de Fyn à l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ dans les plaquettes $\text{Lnk}^{-/-}$. Ces résultats montrent que Lnk régule la signalisation *outside-in* de l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ en participant à la formation du complexe comprenant l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ et Fyn, aboutissant ainsi à la stabilisation du thrombus *in vivo*.

L'ensemble des fonctions de Lnk et des mécanismes identifiés dans les cellules d'origine hématopoïétique, est répertorié dans le tableau ci-dessous (Figure 11)

Type cellulaire	Hormone-cytokine/Rcp	Signaling protéine	Facteur de transcription Voie de signalisation	Fonction de Lnk
LT	TCR	ND	NF-AT	Inhibiteur de l'activation
LB	SCF/c-kit	ND	ND	Inhibiteur de la prolifération, maturation
HSC	SCF/c-kit Tpo/c-mpl Epo/EpoR	Gab2 JAK2 JAK2	p42-44 MAPK PI3K STAT5 P38 MAPK PI3K STAT5 MAPK	Inhibiteur de la prolifération
Mastocyte	SCF/c-kit	ND	P38 MAPK c-jun	Inhibiteur de la prolifération, migration
Mégacaryocyte	Tpo/c-mpl	ND	STAT3 STAT5 PI3K P42-44 MAPK	Inhibiteur du développement, ploïdie, libération de plaquette
Plaquette	Intégrines α IIb β 3	Fyn	ND	Spreading sur fibrinogène Stabilisation du thrombus

Figure 11. Fonctions de Lnk dans les cellules d'origine hématopoïétique. Rcp, Récepteur ; ND, non déterminé.

SH2B1, APS et Lnk peuvent donc agir sur des régulateurs et des voies de signalisation communs, le meilleur exemple étant la régulation de l'activation de la protéine kinase JAK2 réalisée par les trois protéines de la famille SH2B. Cependant, leurs actions semblent être différentes et parfois opposées. En effet, si Lnk et APS sont généralement des régulateurs négatifs, la protéine SH2B1 a une fonction d'activateur dans toutes les voies dans lesquelles elle est impliquée. Ainsi, les rôles complexes et parfois ambigus de ces protéines et l'existence de nombreuses isoformes rendent difficile l'étude de leurs fonctions physiologiques chez les mammifères. Lnk est la seule protéine de la famille SH2B à être exprimée chez la drosophile, et les travaux réalisés sur cet insecte ont révélé un rôle inattendu pour Lnk dans la voie de l'insuline et de l'IGF-1 nommée ISS (*Insulin/insulin-like growth factor signaling*) (Werz et al., 2009). Cette voie est connue pour contrôler la taille, le développement, le métabolisme, la reproduction et la longévité des drosophiles. Les drosophiles ayant un défaut dans la transduction de l'ISS, sont plus petites et possèdent un

plus petit nombre de cellules. Les drosophiles $Lnk^{-/-}$ ont un phénotype proche puisqu'elles sont viables mais de petite taille, avec un retard de développement, une stérilité des femelles et une accumulation de lipides. De plus, elles présentent une diminution importante de l'ISS. Chez la drosophile, Lnk agit entre le récepteur de l'insuline et la PI3K dans la cascade de l'ISS et est nécessaire à la fonction de chico, l'homologue de IRS. De plus, le double KO $Lnk^{-/-} / Chico^{-/-}$ est létal (Werz et al., 2009). L'analyse phénotypique des drosophiles mutantes a révélé que la perte de la fonction de Lnk permet une augmentation de la durée de vie et de la survie liée au stress oxydatif et à la privation de nourriture (Slack et al., 2010). Cette résistance à la privation de nourriture est associée à l'augmentation des réserves lipidiques démontrant un défaut métabolique chez ces insectes. Ce rôle dans la régulation de l'homéostasie métabolique n'a pas été observé chez la souris $Lnk^{-/-}$ alors que l'analyse des phénotypes des souris $SH2B1^{-/-}$ et $APS^{-/-}$ a prouvé l'implication de ces deux protéines dans les voies de l'insuline et de la leptine. Les différences observées entre drosophile et souris pourraient avoir plusieurs origines. Chez la souris $Lnk^{-/-}$, les autres protéines de la famille SH2B, SH2B1 et/ou APS, compensent peut être l'absence de Lnk et masque ainsi la fonction physiologique de Lnk dans la voie de l'insuline. Mais il est également probable que chez la drosophile, la protéine ancestrale Lnk possède des fonctions plus larges englobant le rôle des trois protéines présentes chez les mammifères.

III. Les fonctions de Lnk dans les cellules endothéliales

L'expression de Lnk dans les CE a été pour la première fois mise en évidence par notre équipe lors d'une étude comparant le niveau d'expression de gènes entre des CE au repos et activées (Boulday et al., 2002). Ces travaux ont été les premiers à montrer une expression de la protéine Lnk dans des cellules autres que d'origine hématopoïétique. Les rôles importants joués par Lnk dans la différenciation et la maturation de la lignée hématopoïétique, ont logiquement conduit à s'interroger sur une implication potentielle de Lnk dans les fonctions endothéliales.

1. Rôles de Lnk dans les progéniteurs endothéliaux

Une étude sur le développement embryonnaire de souris réalisée par Nobuhisa *et al.*, a montré que les CE tapissant l'aorte dorsale expriment Lnk entre le jour 9,5 et 11,5 (Nobuhisa *et al.*, 2003). Chez l'embryon de souris entre le jour 10,5 et 11 de gestation, les premières HSC définitives émergent de façon autonome dans la région de l'Aorte-Gonade-Mésonephros (AGM). Lnk est donc exprimée dans la région de l'AGM au moment de l'hématopoïèse embryonnaire. *In vitro*, la différenciation des cellules souches embryonnaires donne naissance à la population définitive des cellules hématopoïétiques *via* les précurseurs endothéliaux. Ainsi les HSC, dans les stades précoces de l'hématopoïèse, proviendraient de la différenciation des précurseurs endothéliaux et/ou des hémangioblastes, précurseurs communs aux cellules hématopoïétiques et endothéliales (Ogawa *et al.*, 1999) (Chung *et al.*, 2002). Or, Nobuhisa *et al.* ont également démontré que la surexpression de Lnk dans les précurseurs endothéliaux inhibe l'émergence des HSC. Lnk serait donc un régulateur négatif de l'hématopoïèse embryonnaire de la région de l'AGM. De plus, la culture de cellules embryonnaires (J11,5) de souris issues de la région AGM en présence de cytokines comme le SCF, le bFGF ou l'oncostatine, permet d'obtenir des cellules endothéliales après quelques jours de culture, puis des progéniteurs hématopoïétiques (Mukoyama *et al.*, 1998). Nobuhisa *et al.* ont également montré que la suppression de la liaison entre Lnk et le récepteur c-kit après stimulation au SCF, levait l'inhibition du développement des cellules hématopoïétiques induite par Lnk. Il apparaît donc que Lnk régule négativement la voie de signalisation du SCF/c-kit dans les précurseurs endothéliaux et inhibe ainsi l'hématopoïèse embryonnaire de la région AGM (Nobuhisa *et al.*, 2003).

La population des cellules de la moelle osseuse nommée KSL (*c-kit-positive*, *Sca-1 positive*, *lineage marker-negative*) représente une fraction de HSC mais semble également être une source de progéniteurs endothéliaux, avec une proportion de cellules KSL capable de se différencier en cellule endothéliale et contribuer à la vasculogénèse *in vivo* (Sata *et al.*, 2002). Plusieurs études ont révélé que la transplantation de cellules circulantes CD34 positives contenant des HSC et des progéniteurs endothéliaux favorise la réparation et la régénération du système nerveux central (Asahara *et al.*, 1997)(Taguchi *et al.*, 2004). Comme précédemment décrit, Lnk est connue pour être un régulateur clé de la prolifération des HSC en inhibant la voie de signalisation du SCF (Takaki *et al.*, 2002) et de la Tpo (Seita *et al.*, 2007). Une étude récente a confirmé l'expression de Lnk dans les cellules KSL mais a aussi démontré que les cellules KSL Lnk^{-/-} *in vitro* forment plus de colonies de progéniteurs

endothéliaux que des cellules KSL WT. L'administration *in vivo* de cellules KSL WT chez une souris présentant une lésion de la moelle épinière, augmente l'angiogenèse, l'astroglie et le recouvrement fonctionnel consécutif à la lésion. L'injection de cellules KSL Lnk^{-/-} est encore plus efficace pour induire l'ensemble de ces processus régénératifs. Ces résultats suggèrent que la suppression de Lnk renforce la différenciation des cellules KSL vers la lignée endothéliale. L'augmentation des progéniteurs endothéliaux permettrait alors d'accélérer la vitesse de réparation d'une lésion de la moelle épinière en favorisant le processus d'angiogenèse et d'astroglie (Kamei et al., 2010). De même, l'hypothèse selon laquelle l'inhibition de Lnk permettrait d'augmenter la néovascularisation postnatale par l'accroissement du potentiel de régénération des progéniteurs endothéliaux, a été testée dans un modèle d'ischémie de la patte chez la souris. Il a ainsi été observé que chez les souris Lnk^{-/-}, la perfusion et la néovascularisation de la patte ischémisée sont augmentées en comparaison des souris WT, principalement en raison d'une prolifération et d'une mobilisation des progéniteurs endothéliaux plus importantes (Kwon et al., 2009). Enfin, un dernier modèle *in vivo* de rétinopathie induite par l'oxygène a été testé chez des souris Lnk^{-/-} et a montré que ces souris présentaient une augmentation de la néovascularisation de la rétine et de la maturation du réseau d'astrocytes comparées à des souris WT.

Ces dix dernières années, plusieurs fonctions majeures de Lnk ont été identifiées dans le contrôle du développement des progéniteurs endothéliaux, tant chez la souris adulte qu'au cours du développement embryonnaire. Tout comme dans les cellules hématopoïétiques, Lnk régule négativement la voie de signalisation du SCF/c-kit dans les précurseurs endothéliaux et inhibe ainsi l'hématopoïèse embryonnaire. Cette régulation de la voie de signalisation du récepteur c-kit semble également être à l'origine de l'inhibition de l'expansion des progéniteurs endothéliaux induite par Lnk observée *in vitro*. De plus, la suppression de l'expression de Lnk favorise la différenciation des cellules souches et progénitrices vers la lignée endothéliale. Les modèles *in vivo* ont permis de confirmer le rôle de Lnk dans la régénération vasculaire et plus particulièrement dans le contrôle de l'expansion, la différenciation endothéliale, la mobilisation et le recrutement des progéniteurs endothéliaux. Ainsi, Lnk contrôlerait non seulement l'expansion des HSC dans la moelle osseuse mais également la différenciation d'une partie de ces cellules nécessaire à la vasculogenèse des tissus ischémiques.

2. Rôles de Lnk dans les cellules endothéliales différenciées

Dans le but d'identifier de nouvelles cibles moléculaires impliquées dans la dysfonction endothéliale, notre équipe a réalisé, il y a plusieurs années, une étude comparant l'expression de gènes de cellules au repos à celle de cellules activées par différents stimuli pro-inflammatoires. Le modèle *in vitro* utilisait des CE porcines (PAEC) stimulées par du TNF α , du LPS ou du sérum humain contenant les anticorps naturels xénogéniques (ANX). Cette étape d'activation était suivie de l'extraction des ARN totaux. C'est ainsi que l'analyse de l'expression des gènes par *RNA differential display* puis par *reverse-Northern blot* a mis en évidence un panel de cDNA différemment exprimés lors de l'activation endothéliale, parmi lesquels figurait la protéine Lnk (Boulday et al., 2002). En effet, l'ARNm et la protéine Lnk sont surexprimés lors de l'activation de PAEC par les différents stimuli inflammatoires testés (TNF α , LPS ou ANX), suggérant un rôle pour cette molécule dans l'activation endothéliale. Par la suite, ce résultat a été confirmé dans les CE humaines (Fitau et al., 2006)(Wan et al., 2007). Ce projet initié par Gwénola Boulday a été poursuivi par Juliette Fitau qui a cherché à définir le rôle de Lnk et plus particulièrement à tenter de déterminer si son induction au cours de l'activation endothéliale est associée à une régulation positive ou négative de la voie du TNF α . Ses résultats indiquent que la surexpression de Lnk, obtenue par transduction à l'aide d'un adénovirus recombinant, réduit de façon significative l'activation endothéliale en réponse au TNF α , phénomène révélé par la diminution de l'expression de VCAM-1 et de l'E-sélectine. De plus, la surexpression de Lnk bloque la phosphorylation de p42-44 MAPK induite par le TNF α et l'inhibition chimique de la voie p42-44 MAPK entraîne une diminution de l'expression de VCAM-1 induite par le TNF α . Il apparaît donc que Lnk régule négativement la voie du TNF α en inhibant la phosphorylation de p42-44 MAPK (Fitau et al., 2006). Enfin, Fitau *et al.* ont également démontré que l'expression de Lnk est associée à une forte phosphorylation de la kinase Akt (sérine 473). Cette phosphorylation, traduisant l'activation de la PI3K, est présente dans les CE au repos et est persistante après activation des CE par le TNF α . L'activation de la PI3K induite par Lnk conduit à la surexpression de NOS3 (eNOS) et de l'hème oxygénase 1 (HO-1). Ces résultats suggèrent donc que Lnk est un régulateur négatif de l'inflammation induite par le TNF α dans les CE.

Objectifs de la thèse

L'activation et la dysfonction endothéliales jouent un rôle clé dans les processus inflammatoires. En transplantation, ces processus participent pleinement à l'initiation et au développement des mécanismes de rejet d'allo et de xéno greffe. En effet, l'activation des CE induit le recrutement et l'infiltration des leucocytes dans le greffon, initiant ainsi les épisodes de rejet aigu. Dans le cas d'une inflammation chronique, la dysfonction endothéliale contribue à la prolifération et à la migration des CML et des CE, entraînant le remodelage vasculaire caractéristique de l'artériosclérose du greffon.

Depuis plusieurs années, un des axes de recherche 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 xénotransplantations.

L'étude sur la protéine adaptatrice Lnk présentée dans ce manuscrit fait suite aux travaux réalisés au sein de notre équipe par Gwénola Boulday et Juliette Fitau. Un premier travail d'identification de cibles moléculaires impliquées dans la dysfonction endothéliale a permis de mettre en évidence la surexpression de Lnk dans les CE porcines suite à une activation par des stimuli pro-inflammatoires (TNF α , LPS) (Boulday et al., 2002). Par la suite, le rôle de Lnk dans la voie du TNF α a été confirmé dans les CE humaines et une étude plus approfondie des mécanismes a montré que Lnk est un régulateur négatif de cette voie *via* l'inhibition de la phosphorylation de p42-44 MAPK (Fitau et al., 2006).

Cependant, parallèlement à ces travaux, plusieurs observations nous ont laissé penser que Lnk avait d'autres fonctions qui ne seraient pas restreintes au contrôle de l'inflammation dans les CE. Ces constatations nous ont poussés à poursuivre la caractérisation de cette protéine adaptatrice. En effet, nous avons noté que la surexpression de Lnk entraîne une modification importante de la morphologie des CE ainsi que du réseau d'actine. Cette observation était confortée par une étude réalisée en 2000 par He *et al.*, qui rapporte une interaction entre Lnk et une protéine structurelle liant l'actine nommée ABP-280 (*actin binding protein 280*) ou filamine A. Cette étude a montré la liaison entre Lnk et ABP-280, ainsi qu'une distribution en réseau filamentueux des deux protéines et leur co-localisation au

niveau de la membrane plasmique de cellules COS-7. Ce travail, le seul publié au moment du début de nos recherches, évoquait un rôle pour Lnk dans l'organisation du cytosquelette. De plus, la littérature montre clairement des fonctions dans la régulation de l'actine pour les deux autres membres de la famille SH2B, suggérant des propriétés similaires pour Lnk.

Ces différents éléments nous ont donc incités à poursuivre la caractérisation de Lnk en nous intéressant cette fois, aux mécanismes de signalisations qui régissent les fonctions endothéliales associées à la réorganisation du cytosquelette. Dans un premier temps, j'ai pu montrer que la protéine adaptatrice Lnk est impliquée dans la voie de signalisation de la sous-unité $\beta 1$ des intégrines. L'utilisation d'un vecteur adénoviral codant pour l'ADNc de Lnk, a permis d'étudier l'effet fonctionnel de l'augmentation d'expression de Lnk dans les processus d'adhésion, de survie et de migration des CE. Cet outil permet de transduire efficacement les cultures primaires de CE humaines issues d'artères (HAEC), isolées par notre équipe. La surexpression de Lnk induit une augmentation de la vitesse d'adhésion des CE à la matrice, corrélée à une augmentation du nombre d'adhésions focales. De plus, Lnk protège les cellules de l'anoïkis par une activation de la PI3K qui est révélée par la phosphorylation d'Akt et de GSK3 β . La migration endothéliale a été évaluée par un test de recouvrement d'une lésion faite sur un tapis cellulaire confluent, suivi par vidéomicroscopie en temps réel (time-lapse). Cette approche a montré que l'expression de Lnk entraîne une diminution significative de la migration. Par l'emploi de siRNA et d'un vecteur d'expression, nous avons finalement pu démontrer que la diminution de l'expression de l' α -parvine est en partie responsable de l'inhibition de la migration induite par Lnk. L'ensemble de ces résultats est décrit dans la partie I et fait l'objet d'un article actuellement en soumission dans le *Journal of Biological Chemistry*. La présentation de ce travail sera précédée d'une courte introduction décrivant la famille des intégrines, les points d'adhésion et le cytosquelette d'actine.

La deuxième partie de mon travail de thèse a été consacrée à l'étude d'une possible application à la xénotransplantation des fonctions anti-inflammatoires de Lnk. L'étude à l'origine de nos travaux a montré une surexpression de Lnk dans des cultures primaires de CE porcines (PAEC) activées par un stimulus xénogénique (sérum humain) (Boulday et al., 2002). La démonstration de son rôle d'inhibiteur de l'expression des molécules d'adhésion

induite par le TNF α dans les cellules humaines, font de Lnk une cible particulièrement intéressante dans le contrôle de l'activation endothéliale (Fitau et al., 2006). Sur la base de ces résultats, j'ai étudié en collaboration avec Mathias Chatelais, le rôle de Lnk dans la prévention de l'activation et de l'apoptose des PAEC. Dans un premier temps, nous avons testé l'efficacité d'infection de l'adénovirus sur les PAEC WT ou Gal^{-/-} (Gal-KO). Puis, nous avons confirmé que Lnk inhibe l'expression de VCAM-1 après un traitement au TNF α dans les CE porcines. De plus, nous avons testé l'impact de l'expression de Lnk sur l'anoïkis et l'apoptose médiée par le TNF α . Ces expériences ont montré le rôle protecteur de Lnk qui diminue l'anoïkis, évaluée à l'aide d'un marquage de la fragmentation de l'ADN par l'iodure de propidium (*DNA content*), ainsi que l'apoptose, quantifiée par la mesure de l'activité des caspases 3 et 7. L'ensemble de ces données est présenté dans la partie II sous la forme d'un article en préparation. Une introduction préalable présentera les différents rejets associés à la xénogreffe, les différentes stratégies mise en place pour les éviter, et le phénomène d'accommodation.

Au cours de ma thèse, j'ai également eu l'occasion de participer aux travaux portant sur la voie de signalisation Notch, réalisés au sein de notre équipe par Thibaut Quillard. Dans ce projet, nous avons plus particulièrement étudié le rôle de Notch dans la dysfonction endothéliale. Pour ce faire, nous avons analysé l'expression et les régulations des molécules Notch dans les CE en réponse aux cytokines inflammatoires. Les mécanismes moléculaires à l'origine des régulations de Notch ont également été examinés par l'emploi d'inhibiteurs chimiques des voies NF κ B, PI3K ou JNK MAPK. Ces outils nous ont permis de démontrer qu'en réponse aux médiateurs solubles de l'inflammation, comme le TNF α , les CE présentent une profonde modification du phénotype Notch. Nous avons observé que le récepteur Notch4 est sous-exprimé dans les CE activées, alors qu'à l'inverse, le récepteur Notch2 est fortement surexprimé et suractivé. Dans un deuxième temps, nous avons étudié l'impact fonctionnel de l'augmentation de l'expression et d'activité de Notch2 par l'utilisation d'un adénovirus codant pour le domaine intracellulaire N2ICD. Nos résultats montrent que la surexpression de N2ICD diminue la viabilité cellulaire par l'induction de l'apoptose. Enfin, nous avons montré que la survivine est le principal responsable de la fonction apoptotique de Notch2 dans les CE. Ces travaux font l'objet de deux publications,

dans *PLoS ONE* en 2009 et *Biochemical Pharmacology* en 2010, présentées dans une troisième partie.

RESULTATS

Partie I : Fonctions régulatrices de la protéine adaptatrice Lnk dans la voie des intégrines des CE humaines

Les CE sont des cellules adhérentes qui ne peuvent survivre qu'en interagissant avec la MEC, formée d'un maillage de macromolécules extracellulaires. Les interactions des cellules avec la MEC initient de multiples réponses qui ont pour but de réguler le comportement et le devenir cellulaire. La matrice fournit un microenvironnement qui sert de tissu de soutien et permet l'attachement des cellules mais guide également la migration des cellules durant le développement embryonnaire ou la réparation de tissus. Au-delà de ces propriétés de support, elle permet la transmission de signaux extracellulaires, qui contrôlent de nombreux processus cellulaires tels que la prolifération, la différenciation ou l'apoptose. Les stimuli extérieurs sont transmis sous forme de signaux biochimiques intracellulaires par l'intermédiaire de récepteurs transmembranaires tels que les intégrines et les récepteurs de facteurs de croissance, ou par des stimuli mécaniques comme les forces de cisaillement qui provoquent la déformation du cytosquelette d'actine.

La protéine Lnk modifie la morphologie des CE et le cytosquelette d'actine. Nous allons étudier dans cette première partie par quels mécanismes et quelles voies, Lnk agit sur le cytosquelette et si ces modifications ont un impact sur des fonctions cellulaires telles que l'adhésion, la migration et la survie cellulaire. Les résultats de cette étude sont présentés sous forme d'un article actuellement en soumission.

Dans une introduction préalable, la structure des intégrines ainsi que leurs fonctions dans les CE sont présentées. Au-delà de leur rôle de ligand de la matrice, les intégrines sont le point d'ancrage de nombreuses protéines intracellulaires assemblées en point d'adhésion. L'organisation moléculaire de ces complexes protéiques est abordée et une attention particulière est accordée à la protéine α -parvine. Pour finir, l'organisation du cytosquelette et son rôle dans le processus de migration sont décrits.

Présentation de la voie des intégrines et des points d'adhésion

Les tissus sont formés par un ensemble de cellules concourant à la même fonction. Afin de permettre la formation d'une structure homogène, les cellules adhèrent entre elles directement mais également par le biais de la MEC. L'interaction d'une cellule avec sa matrice se fait par les différents récepteurs d'adhérence exprimés à la membrane plasmique dont les intégrines. L'adhésion des cellules nécessite l'expression de ces récepteurs protéiques mais également leur regroupement et leur organisation en points d'adhésion. Ceux-ci sont constitués de l'association complexe d'un grand nombre de molécules qui forment des sites de contact avec la MEC. Les points d'adhésion sont des structures hautement dynamiques qui s'assemblent et se désassemblent en permanence. Ils sont à la base de la signalisation intracellulaire et régulent de nombreux processus cellulaires tels que la prolifération, la survie, la morphologie cellulaire, mais aussi la polarité et la motilité des cellules (Brakebusch et al., 2002).

I. La famille des intégrines

1. Structure générale

Les intégrines représentent une grande famille de récepteurs d'adhésion cellulaire, qui contribue à l'adhérence cellule-cellule et cellule-MEC. Ces glycoprotéines transmembranaires sont constituées de deux sous-unités α et β associées de façon non-covalente. Chaque sous-unité est composée d'un large domaine extracellulaire terminé par une tête globulaire qui contient le site de fixation du ligand, d'un domaine transmembranaire qui ancre l'intégrine dans la membrane plasmique, et d'un domaine cytoplasmique court qui interagit avec le cytosquelette d'actine de la cellule, par le biais de molécules intermédiaires (Figure 12). A ce jour, 18 chaînes α et 8 chaînes β sont connues chez les mammifères et forment 24 intégrines (combinaisons de dimères $\alpha\beta$) différentes, chacune présentant des propriétés de liaison et de transmission du signal différentes (Hynes, 2002). En effet, l'analyse de souris génétiquement invalidées pour différentes intégrines, a

clairement montré que chaque combinaison de dimères possède des fonctions spécifiques non redondantes (pour revue (Bouvard et al., 2001) (Hynes, 2002)).

Il est possible de classer les intégrines en plusieurs sous-familles selon différents critères : leur évolution au cours du temps, leur structure et leurs ligands. La classification reposant sur la structure des intégrines, permet de former deux grands groupes. D'un côté, les intégrines qui possèdent dans leur sous-unité α un domaine nommé αA (ou αI), et de l'autre, celles qui en sont dépourvues (Lee et al., 1995). Le domaine αA est impliqué dans la reconnaissance du collagène, il doit son nom à sa structure très proche du domaine A du vWF. La sous-unité β possède un domaine similaire nommé βA (Figure 12) (Tuckwell et Humphries, 1997).

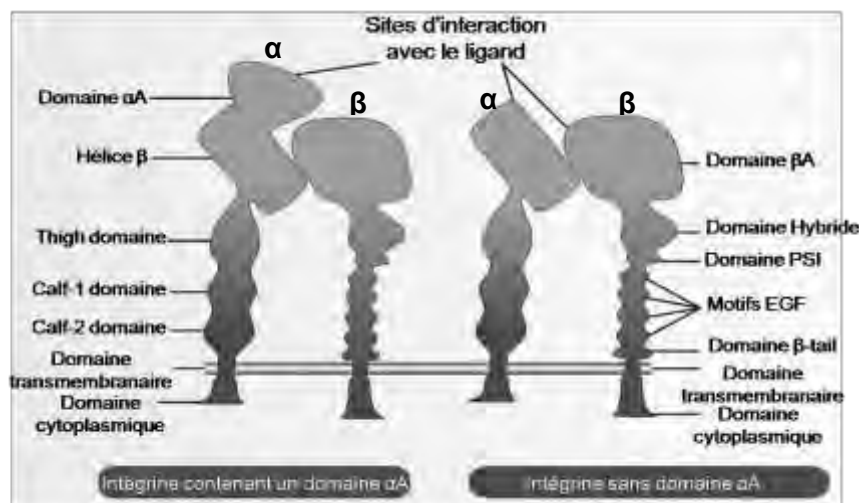


Figure 12. Structure générale d'intégrines avec ou sans domaine αA . Dans sa partie N-terminale, la sous-unité α contient des motifs FG (phényl-alanine-glycine) et GAP (glycine-alanine-proline) organisés en hélice β . Ces motifs FG-GAP possèdent des sites de liaisons pour des cations bivalents, tels que Mg^{2+} , Mn^{2+} et Ca^{2+} , qui modulent la fixation au ligand. Le domaine αA , présent chez 9 sous-unités sur 18, contient un site MIDAS (*metal ion-dependent adhesion site*) pouvant lier des ions Mg^{2+} . Ces régions sont suivies par 3 domaines organisés en feuillets β : un *tighi* et deux *calf* domaines. Dans sa partie N-terminale, la sous-unité β contient un domaine assimilé au domaine αA et appelé βA , un domaine PSI (pléxines, sémaphorines, intégrines), suivie de quatre séquences répétées de type *EGF-like*.
D'après (Humphries et al., 2006)

Une autre classification, couramment employée, repose sur les différents ligands des intégrines. Bien que les intégrines se lient généralement avec divers ligands, et que la plupart des ligands sont reconnus par plusieurs membres de la famille des intégrines, il est possible de former quatre classes d'intégrines en se basant sur la spécificité de liaison de ces récepteurs. Le premier groupe est constitué des cinq intégrines αV , de deux intégrines $\beta 1$ ($\alpha 5$, $\alpha 8$) et de l' $\alpha IIb\beta 3$, qui partagent la capacité à reconnaître le tripeptide RGD (arginine-

de l'intérieur vers l'extérieur de la cellule, est appelé *inside-out signaling*. Dans les CE, ce processus est initié par des cytokines, des facteurs de croissance comme le VEGF ou par les forces de cisaillement (Byzova et al., 2000) (Tzima et al., 2005). L'activation des intégrines est un processus physiologique qui est exacerbé dans un contexte pathologique tel que l'angiogenèse tumorale (Contois et al., 2009). Depuis maintenant une vingtaine d'années, il est prouvé que l'affinité des intégrines pour leurs ligands est régulée par des changements de leur conformation (Frelinger et al., 1990). Les intégrines sont connues pour adopter trois états structurels différents : un état inactif de faible affinité pour le ligand, un état préparé ou « *primed* » d'affinité intermédiaire et un état actif, de haute affinité (Figure 14, A) (pour revue (Askari et al., 2009)). De nombreuses avancées ont été faites dans la compréhension de ces conformations, notamment grâce à l'étude des premières structures cristallographiques des dimères d'intégrines (Xiong et al., 2001) (Xiao et al., 2004) ; cependant plusieurs points restent controversés. En effet, la nature précise de chaque état de conformation ainsi que les facteurs permettant le changement d'un état à un autre, ne font pour le moment pas l'unanimité. Le modèle le plus couramment proposé est le suivant : dans son état inactif, l'intégrine est repliée sur elle-même et forme un coude, le site de liaison au ligand est alors inaccessible. L'intégrine se lie ensuite à une protéine *via* ces domaines cytoplasmiques, ce qui entraîne la dissociation des sous-unités α et β et l'exposition du domaine de liaison au ligand (l'épitope d'activation), c'est l'étape de priming durant laquelle l'intégrine se « redresse » et acquiert la faculté de se lier au ligand. Enfin, l'intégrine interagit avec son ligand en se dépliant complètement et se trouve alors en conformation active (Figure 14, A) (Calzada et al., 2002) (Takagi et Springer, 2002) (Nishida et al., 2006). Néanmoins, il a été montré que les intégrines peuvent également interagir avec leur ligand dans un état replié ou partiellement détendu (Arnaout et al., 2007). L'adhésion plus ou moins forte des intégrines à la matrice, est caractérisée par la régulation de l'affinité de liaison mais aussi par la « valence » (ou avidité). Si l'affinité résulte des changements de conformation de l'intégrine, la modification de la valence implique le déplacement des intégrines le long de la membrane et leur regroupement en clusters (Figure 14, B) (Carman et Springer, 2003). Ce processus renforce l'adhésion en augmentant le nombre de liaisons entre récepteurs et ligands.

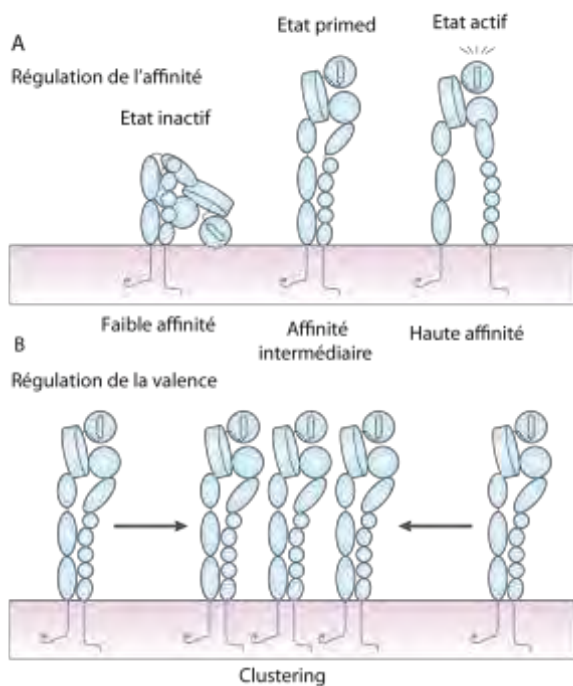


Figure 14. Régulation des intégrines. A. Régulation de l'affinité des intégrines par des modifications conformationnelles. B. Régulation de la valence des intégrines par regroupement des intégrines (clustering)

D'après (Kinashi, 2005)

Les domaines cytoplasmiques des sous-unités α et β possèdent des sites d'interaction avec différentes protéines impliquées dans la signalisation *inside-out* activant les intégrines. La taline est une protéine du cytosquelette de 250 kDa, capable de se lier à la fois aux intégrines et à l'actine. Cette protéine des points d'adhésion co-localise avec les intégrines activées et interagit avec la partie cytoplasmique de la sous-unité β (Pfaff et al., 1998). Cette interaction semble être à l'origine d'un des nombreux points de contrôle de l'activation des intégrines. En effet, des études, utilisant des techniques de RNAi (RNA interférence), ont montré que l'extinction spécifique de l'expression de la taline dans des cellules CHO (*Chinese hamster ovary*), inhibe l'activation de l'intégrine recombinante $\alpha\text{IIb}\beta_3$, sans altérer son expression (Tadokoro et al., 2003). De plus, il a été observé que la diminution de l'expression de la taline empêche les réarrangements conformationnels indispensables au changement d'affinité des intégrines. Tadokoro *et al.* ont été plus loin en démontrant que seules les mutations affectant les sites d'association du domaine PTB-like (*phosphotyrosine binding-like*) de la taline, occasionnent une diminution de l'activation de l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta_3$. Ces résultats soutiennent que la taline induit l'activation des intégrines en se liant à la partie cytoplasmique de la sous-unité β *via* son domaine PTB-like. D'un point de vue mécanistique, la taline participerait à la dissociation des sous-unités α et β permettant le priming des

intégrines, en rompant un pont salin formé entre un résidu Arg (arginine) porté par la chaîne α et un résidu Asp (acide aspartique) porté par la chaîne β (Vinogradova et al., 2002).

3. Les grandes fonctions des intégrines dans les CE

a. L'adhésion cellulaire

L'interaction des cellules avec les composants de la MEC *via* les intégrines est indispensable à la croissance, la différenciation et la survie cellulaire. Les CE expriment de nombreuses intégrines (Figure 15), dont l'expression est régulée par la MEC mais aussi par des facteurs de croissance comme le FGF (Enenstein et al., 1992) ou les forces de cisaillement (Shyy et Chien, 2002). L'adhésion des CE induit la prolifération alors que leur mise en suspension aboutit à l'initiation du programme de mort cellulaire (Eliceiri et Cheresh, 2001). L'adhésion joue un rôle clé dans la prolifération cellulaire grâce à la signalisation croisée des intégrines et des récepteurs tyrosine kinase des facteurs de croissance. Ces événements conduisent à l'activation des kinases cycline-dépendantes (CDK) et au passage du cycle cellulaire en phase G1 (Klein et al., 2007). Ces résultats sont en faveur d'un lien direct entre les interactions intégrines/MEC et le cycle cellulaire. De plus, la liaison des intégrines induit une variété de processus intracellulaires comme l'augmentation de la synthèse des lipides inositols, la phosphorylation de FAK, l'activation de ERK1/2 et l'expression de la cycline D1 (Walker et al., 2005) qui facilitent la progression dans le cycle cellulaire.

Intégrine	Principaux ligands
$\alpha 1\beta 1$	CO, LM
$\alpha 2\beta 1$	CO, LM, VN, TSP, TN-C
$\alpha 3\beta 1$	CO, LM, FN, TSP, EL
$\alpha 5\beta 1$	FN, TSP
$\alpha 6\beta 1$	LM
$\alpha 6\beta 4$	LM
$\alpha 8\beta 1$	FN, VN, TN-C
$\alpha v\beta 1$	FN, VN
$\alpha v\beta 3$	FN, VN, FB, TSP, TN-C, vWF, dCO, DP, MMP-2
$\alpha v\beta 5$	FN, VN

Figure 15. Intégrines exprimées par les CE vasculaires et leurs principaux ligands. CO, collagène ; dCO, collagène dénaturé ; EL, élastine ; FB, fibronectine ; LM, laminine ; MMP-2, metalloprotéinase ; OPN, osteopontine ; TN-C, tenascine-C ; TSP, trombospondine ; VN, vitronectine ; vWF, von willebrand factor

D'après (Rüegg et Mariotti, 2003)

b. La survie cellulaire

Les intégrines sont des déterminants essentiels de la survie endothéliale (Re et al., 1994). L'absence d'adhésion et d'étalement cellulaires induit une apoptose rapide des CE, appelée anoïkis (Frisch et Ruoslahti, 1997). Il a été montré, chez la souris, que le traitement de tumeurs par des antagonistes des intégrines, provoque la mort des CE et par conséquent la régression de l'angiogenèse tumorale (Brooks et al., 1994). Cependant, le mécanisme initiant l'apoptose des CE en suspension, reste mal défini. Il est probable que l'anoïkis soit le résultat de l'association de plusieurs évènements.

Les intégrines, lorsqu'elles sont en contact avec la matrice, transmettent différents signaux de survie tels que l'expression de Bcl-2 (Frisch et al., 1996), l'inhibition de p53 (Strömblad et al., 1996), l'activation de MEKK1/ERK (Cardone et al., 1997), de NF κ B (Scatena et al., 1998) et de Akt (Khwaja et al., 1997). La perte de l'interaction entre les intégrines et la MEC, entraîne l'arrêt de la propagation de ces signaux anti-apoptotiques et l'initiation de l'anoïkis. Pour exemple, la liaison des intégrines activent Akt par l'intermédiaire de deux kinases des points d'adhésion : FAK et ILK. La surexpression de FAK confère aux fibroblastes une résistance à l'anoïkis qui serait indépendante des facteurs de croissance (Frisch et al., 1996). De même, ILK protège les cellules de l'anoïkis et cette inhibition de l'apoptose est corrélée à la phosphorylation et l'activation d'Akt (Attwell et al., 2000). Inversement, l'inhibition d'ILK rend différentes lignées de cellules cancéreuses sensibles à l'apoptose. Ces résultats font de FAK et d'ILK des régulateurs majeurs de l'anoïkis. La signalisation médiée par les intégrines induit l'augmentation de molécules anti-apoptotiques protégeant ainsi les CE de la mort cellulaire.

Mais, le détachement de la matrice peut également participer activement à l'apoptose des cellules. Les intégrines, en l'absence de liaison avec un ligand, sont directement associées à l'activation de la pro-caspase 8 (Stupack et al., 2001). L'anoïkis est donc en partie le résultat de la voie extrinsèque de l'apoptose. En effet, il a été montré que la voie des récepteurs de mort contribue à l'anoïkis des cellules qu'elles soient malignes ou non (Sakamoto et Kyprianou, 2010). Cette voie est activée par l'interaction des ligands FAS ou TRAIL (*TNF-related apoptosis inducing ligand*), au domaine extracellulaire du récepteur de mort. Les domaines de mort tels que DED (*death effector domain*) ou FADD (*Fas-associated death domain*) lient la caspase 8 et entraînent la formation du complexe de signalisation DISC (*death inducing signaling complex*). Ce complexe favorise la dimérisation de la caspase

qui devient alors active. La stimulation des effecteurs de la caspase 8 conduit à l'apoptose des cellules (Simpson et al., 2008). Lors de la perte de contact entre la cellule et la MEC, l'expression du récepteur FAS et de son ligand est augmentée, alors que celle de FLIP, un inhibiteur endogène de la voie des récepteurs de mort, est diminuée (Aoudjit et Vuori, 2001). Ces changements sont responsables de l'activation de la caspase 8 par l'intermédiaire de FADD et aboutissent à l'apoptose des CE en suspension (Rytömaa et al., 1999).

Enfin, la modification de la structure de la cellule entraînée par la perte de support, joue un rôle dans ce phénomène. Le détachement des CE provoque la dissolution des points d'adhésion et modifie l'architecture du cytosquelette. Des régulateurs de l'apoptose, comme Bim (*Bcl2-interacting mediator of cell death*) et Bmf (*Bcl2-modifying factor*), sont associés au cytosquelette, sa rupture entraîne leur libération et l'induction de la mort cellulaire (Puthalakath et al., 1999) (Puthalakath et al., 2001).

c. La migration et l'angiogenèse

La migration endothéliale sur la MEC est une des étapes essentielles de l'angiogenèse. Les intégrines sont connues pour participer activement à la migration endothéliale en reliant les protéines de la MEC au cytosquelette et aux voies de signalisation intracellulaires (Moissoglu et Schwartz, 2006). La migration nécessite une série d'étapes : la polarisation cellulaire, la formation d'extensions membranaires, la polymérisation de l'actine, la formation et la stabilisation des points d'adhésion suivies de la rétraction de la cellule vers l'avant (Lamallice et al., 2007). Chacun de ces processus est dépendant des intégrines.

Les principaux dimères impliqués dans la migration endothéliale sont les intégrines $\alpha V\beta 3$ (Byzova et al., 1998), $\alpha V\beta 5$ et $\alpha 5\beta 1$ (Hood et Cheresh, 2002). Cependant, leur fonction peut être différente voire opposée et chaque dimère peut induire un *signaling* particulier. Pour exemple, l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ inhibe la migration lorsqu'elle se lie à la fibronectine (Giancotti et Ruoslahti, 1990), alors que l' $\alpha V\beta 6$ la favorise (Thomas et al., 2001). Les preuves de l'implication des intégrines dans le développement vasculaire de l'embryon et l'angiogenèse post-natale, proviennent d'expérimentations animales. La souris déficiente en $\alpha 5\beta 1$ meurt précocement durant le développement embryonnaire en raison d'un défaut vasculaire important (Yang et al., 1993). Les embryons présentent un retard dans le développement du plexus capillaire, ainsi qu'un défaut de leur maturation. Les vaisseaux de l'embryon et de la vitelline, sont anormaux et peu nombreux. Ces résultats démontrent le

rôle essentiel de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ dans la vasculogénèse et l'angiogénèse. De même, les embryons de souris $\alpha 4\beta 1^{-/-}$ meurent prématurément en raison d'un développement retardé des vaisseaux, notamment coronariens (Yang et al., 1995). L'utilisation d'antagonistes des intégrines $\alpha V\beta 3$ et $\alpha V\beta 5$ suppriment l'angiogénèse tumorale et l'angiogénèse induite par le VEGF ou l'hypoxie, chez des souris adultes (Eliceiri et Cheresh, 2000). Ces résultats font des intégrines des cibles thérapeutiques de choix dans les pathologies telles que le cancer, l'inflammation chronique et les maladies cardiovasculaires. L'une des plus prometteuses est l'intégrine $\alpha V\beta 3$, dont les antagonistes ont déjà montré des résultats dans le traitement de cancers chez l'homme (Liu et al., 2008).

La fixation des intégrines à leurs ligands entraîne la transduction de nombreux signaux, impliqués dans les processus d'adhésion, de survie et de migration des CE. Ces signaux partant cette fois de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule, sont regroupés sous le terme d'*outside-in signaling*. Comme dans l'*inside-out signaling*, ces voies de signalisation s'appuient principalement sur les protéines du cytosquelette et des points d'adhésion.

II. Les points d'adhésion

L'interface entre la membrane et le cytosquelette fait intervenir un grand nombre de protéines regroupées en complexe, nommé point d'adhésion ou point d'adhérence. La plupart des protéines intervenant dans ces structures, peuvent interagir avec plusieurs protéines partenaires, ce qui conduit à l'activation de voies de signalisation diverses et le contrôle de nombreux processus cellulaires. Les points d'adhésion forment ainsi des complexes de signalisation qui régulent les fonctions physiologiques des intégrines.

1. La diversité des points d'adhésion

Les points d'adhésion ont été identifiés pour la première fois par Abercrombie *et al.* en 1971. Ils ont été décrits comme des régions denses de la membrane plasmique formant des jonctions étroites avec la matrice de cellules en culture (Abercrombie et al., 1971). S'il a été suggéré pendant un temps que ces structures n'étaient présentes qu'en culture *in vitro*, leur existence est aujourd'hui clairement démontrée *in vivo*.

Les sites d'adhésion sont formés par toutes les cellules adhérentes mais leurs morphologies, leurs compositions, leurs tailles et leurs localisations subcellulaires varient en fonction de l'environnement et du comportement cellulaire. Toutes les adhésions ont cependant deux points communs : elles sont médiées par les intégrines par le biais du domaine cytoplasmique et sont en interaction avec les filaments d'actine. On distingue principalement quatre types de points d'adhésion : les adhésions précoces, les complexes focaux, les adhésions focales et les adhésions fibrillaires. Les adhésions précoces et les complexes focaux se forment à la périphérie des cellules en cours d'étalement (*spreading*) ou de migration. Plus précisément, les adhésions précoces se localisent à l'extrémité du front de migration, en bordure de l'extension membranaire appelée lamellipode (Choi et al., 2008). Alors que les petites structures adhésives regroupées sous le terme de complexes focaux (CF), sont situées plus en arrière à la jonction entre le lamellipode et la lamella. Elles sont régulées par des protéines de la famille des petites GTPases Rho, notamment Rac et Cdc42 (Nobes et Hall, 1995) (Rottner et al., 1999). Ces structures ont une durée de vie courte et disparaissent rapidement si elles n'évoluent pas en adhésions focales (AF), plus larges et plus matures. Les AF sont régulées par l'activité de Rho et la contraction de l'actomyosine (Ridley et Hall, 1992). Dans une cellule polarisée, ces structures sont présentes sur les bords de la cellule, en arrière mais aussi à l'interface entre le lamellipode et la lamella. Elles sont associées à l'extrémité des fibres de stress dans les cultures *in vitro* et permettent une forte adhésion à la matrice. Des structures semblables sont observées *in vivo*, c'est le cas des adhésions formées par les CE avec la membrane basale (Kano et al., 1996). Les adhésions fibrillaires, quant à elles, forment des adhésions plus allongées et contiennent spécifiquement l' $\alpha 5$ intégrine et la tensine (Figure 16). Elles dérivent des AF liée à la fibronectine, par translocation centripète des extensions membranaires vers le corps cellulaire (Zamir et al., 1999).

Propriétés/Structures	Adhésions précoces	Complexes focaux	Adhésions focales	Adhésions fibrillaires
Localisation	Bordure lamellipode	Jonction lamellipode-lamella	Arrière et bords de la cellule Jonction lamellipode-lamella	Centre de la cellule
Morphologie	Forme arrondie	Forme arrondie	Ovale, allongée	Forme arrondie ou fibrillaire
Taille	0.01 μm^2	0.2 μm^2	2-5 μm^2	1-10 μm^2
Constituants caractéristiques	Paxilline Vinculine FAK	Paxilline Vinculine Protéines tyrosine-phosphorylées	Paxilline Vinculine α -actinine Taline FAK Zyxine	α_5 intégrine Tensine
Induit par	Rac	Rac	Rho	Rho ?

Figure 16. Caractéristiques des principales adhésions à la MEC.

D'après (Geiger et al., 2001) (Choi et al., 2008)

Un dernier type d'adhésion est le podosome qui correspond à une petite structure cylindrique d'environ 0,5 μm de diamètre, contenant des protéines caractéristiques des adhésions focales comme la vinculine ou la paxilline. Les podosomes sont formés au niveau de la membrane plasmique ventrale de cellules telles que les macrophages (Davies et Stossel, 1977), les ostéoclastes (Zamboni-Zallone et al., 1988) ou les cellules endothéliales (Moreau et al., 2003). On peut citer parmi les protéines caractéristiques des podosomes, la gelsoline (Chellaiah et al., 2000) et la dynamine (Ochoa et al., 2000). Outre la présence de ces marqueurs spécifiques, ils se distinguent des AF par la présence de métalloprotéases.

Les cellules cancéreuses invasives et les cellules transformées par l'expression de l'oncogène v-Src (Tarone et al., 1985) présentent des structures très proches des podosomes, appelées invadopodes. Ces points d'adhésion sont le site d'une polymérisation rapide de l'actine et sont capables de dégrader la MEC (Weaver, 2008). Leur architecture caractéristique, en forme de protrusion sous la cellule, leurs propriétés dynamiques (demi-vie d'environ 30 minutes, plus élevée que celle des podosomes) ainsi que leur localisation subcellulaire, les différencient des podosomes (pour revue (Albiges-Rizo et al., 2009)).

Bien que ces sites d'adhésion présentent des caractéristiques spécifiques, les différences moléculaires et fonctionnelles restent encore aujourd'hui peu caractérisées. D'autres paramètres, comme les forces de tensions sont à prendre en compte. En effet, la

maturation des adhésions précoces en AF semble dépendre des forces de tension (Riveline et al., 2001). Les AF seraient des sondes mécaniques, s'assemblant en réponse aux forces locales (Geiger et Bershadsky, 2002).

2. La structure des points d'adhésion

Zaidel-Bar et al. ont réalisé en 2007, un atlas présentant « l'adhésome des intégrines » répertoriant l'ensemble des molécules participant aux points d'adhésion ainsi que leurs différentes interactions (Zaidel-Bar et al., 2007a). Cette équipe a ainsi établi, *in silico*, un réseau complexe composé de 156 molécules, liées et/ou modifiées par 690 interactions. Dans cette étude, les auteurs ont distingué les 90 composants qui participent physiquement aux points d'adhésion, des 66 composants périphériques qui interagissent avec les composants intrinsèques des adhésions et affectent leur activité et leur devenir. Cependant, la barrière entre composants intrinsèques et associés est floue : certaines protéines intrinsèques peuvent être des membres transitoires des adhésions, jouant leur rôle puis quittant les adhésions, et inversement, les protéines associées peuvent résider dans les points d'adhésion selon certaines conditions.

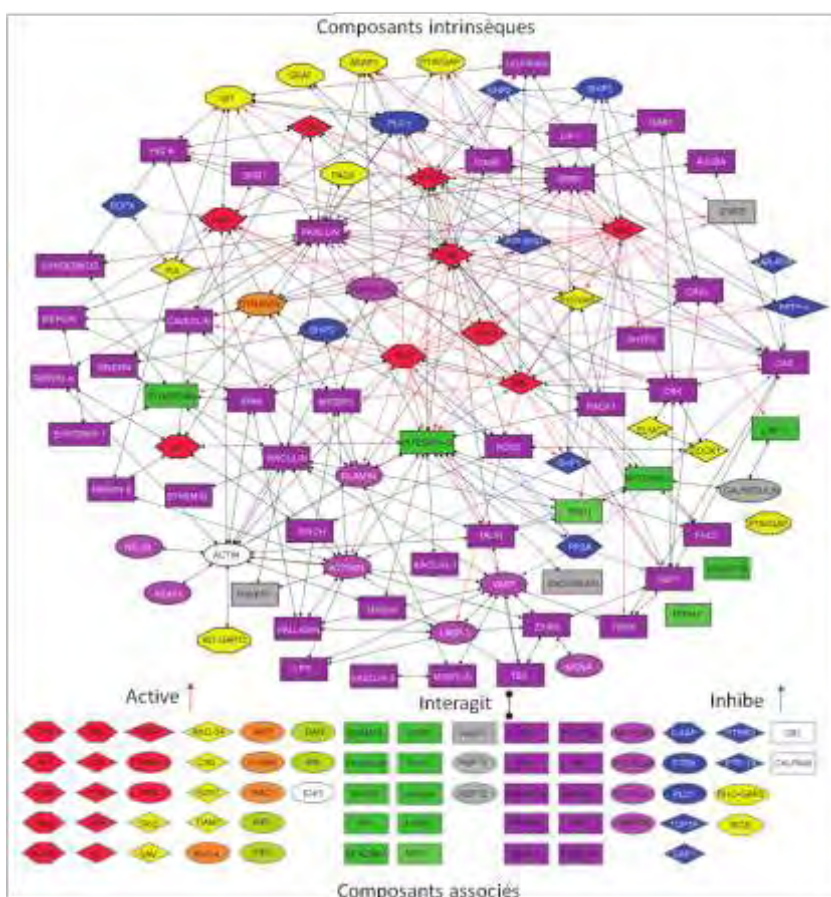


Figure 17. Atlas de l'adhésome des intégrines représentant les composants intrinsèques et associés des AF ainsi que leurs interactions. D'après (Zaidel-Bar et al., 2007a)

Il est également possible de répertorier les molécules des points d'adhésion en fonction de leurs propriétés structurelles ou fonctionnelles. L'ensemble des protéines se répartit alors en deux catégories : les protéines de structure et celles de signalisation.

Les protéines de structure ancrent directement ou indirectement les filaments d'actine aux intégrines, et servent de matrice pour la fixation des autres constituants des points d'adhésion. Les principales protéines de ce groupe sont la taline, l' α -actinine, la tensine, ILK ou la parvine, qui fera l'objet du paragraphe suivant.

Les intégrines ne possèdent pas d'activité enzymatique intrinsèque c'est pourquoi, afin d'assurer la transmission des signaux, elles recrutent des molécules de signalisation. Parmi ces protéines, on distingue les tyrosine kinases comme FAK, Src et Abl, les tyrosine phosphatases comme SHP-2 et PTEN et les sérine/thréonine kinases comme PAK. Les protéines de la famille des Rho GTPases sont également des molécules majeures de la signalisation qui régulent le cytosquelette d'actine. Les protéines adaptatrices telles que la paxilline et Grb2, participent et contrôlent l'assemblage des complexes protéiques. Enfin, les lipides comme le phosphatidyl-inositol-4,5-diphosphate (PIP2) et le phosphatidyl-inositol-3,4,5-triphosphate (PIP3) régulent les interactions des protéines adaptatrices, comme la vinculine, avec l'actine.

L'ensemble de ces protéines forment ainsi un réseau complexe (Figure 18) mais dans lequel chaque composant est essentiel. L'analyse d'organismes modèles génétiquement invalidés, a confirmé l'importance de chaque protéine participant aux AF *in vivo* (pour exemple, la vinculine (Xu et al., 1998)).

Les observations microscopiques de cellules vivantes et le suivi de protéines des adhésions couplées à des fluorochromes, ont montré que les points d'adhésion sont des structures extrêmement dynamiques (Giannone et al., 2007). Au cours de la migration, elles s'assemblent et se désassemblent continuellement, leur composition change au cours du temps et s'adapte aux stimuli extracellulaires. Le recrutement des différentes protéines est un processus hiérarchisé dans le temps et l'espace permettant l'étalement, la polarisation, et la migration de la cellule.

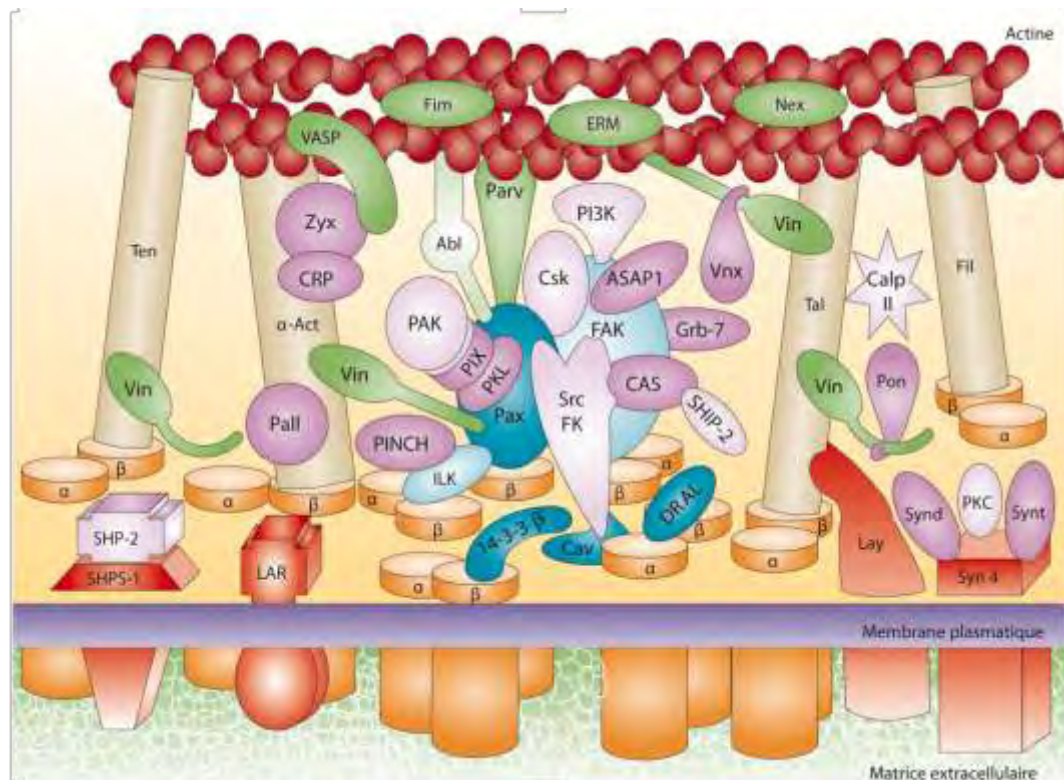


Figure 18. Schéma représentant la complexité du réseau des principales protéines constituant les AF. Les récepteurs d'adhésion sont représentés en orange, on distingue les intégrines (sous-unités α et β) et les molécules associées à la membrane comme la syndecane 4 (Syn 4), la layiline (Lay), la protéine LAR et SHPS-1. Les protéines qui interagissent avec les intégrines et l'actine sont représentées en marron : l' α -actinine (α -Act), la taline (Tal), la tensine (Ten) ou la filamine (Fil). Les molécules associées aux intégrines sont en bleu avec FAK, ILK, DRAL, 14-3-3 β et la cavéoline (Cav). En vert sont représentées les protéines associées à l'actine comme VASP, la nexilline (Nex), la parvine (Parv), la vinculine (Vin), la fimbrine (Fim), ERM, Abl kinase. Enfin en violet, les protéines adaptatrices incluant la zyxine (Zyx), CRP, la palladine (Pal), PINCH, PKL, PIX, la vinexine (Vnx), la ponsine (Pons), Grb-7, ASAP1, la syntenine (Synt) et la syndesmos (Synd). Parmi celles-ci on retrouve de nombreuses enzymes comme SHP-2, SHIP-2, PAK, PI3K, les kinases de la famille (Src FK), Csk, Calp II et PKC. D'après (Geiger et al., 2001)

3. Une protéine des adhésions focales : l' α -parvine

a. La famille des parvines

La famille des protéines parvines est constituée de trois membres : l' α -parvine, exprimée de façon ubiquitaire, la β -parvine, particulièrement présente dans le cœur et les muscles squelettiques et la γ -parvine dont l'expression est restreinte aux cellules hématopoïétiques (Korenbaum et al., 2001). Plusieurs laboratoires les ont découvertes indépendamment, grâce à leurs protéines partenaires et leur structure. Ainsi l' α -parvine (aussi appelée actopaxine, et CH-ILKBP pour *calponin homology domain-containing ILK*

binding protein) a été identifiée pour la première fois par Nikolopoulos et Turner, comme une nouvelle protéine partenaire de l'actine et de la paxilline (Nikolopoulos et Turner, 2000). Un an plus tard, l' α -parvine est clonée par Tu et al. qui démontrent son interaction avec ILK. Cette équipe décrit plus précisément la structure de l' α -parvine en discernant la présence de deux domaines d'homologie à la calponine (CH) (Tu et al., 2001). La même année, Yamaji *et al.* isolent une nouvelle molécule s'associant avec ILK et la nomment affixine, plus tard rebaptisée β -parvine (Yamaji et al., 2001). Les trois protéines, structurellement proches, α -, β -, et γ -parvine seront finalement caractérisées par Olski *et al.* (Olski et al., 2001).

Les parvines sont constituées d'un site de liaison à l'actine formé de deux domaines CH et se terminent par des sites de phosphorylation pour des résidus sérines et thréonine en N-terminal (Figure 19). Le domaine de liaison à l'actine permet aux parvines de recruter la F-actine aux points d'adhésion, et de s'associer aux fibres de stress. Les partenaires des parvines comprennent des protéines liant l'actine et des protéines régulatrices, comme Hic5, α -actinine, CdGAP et α -PIX, un facteur d'échange de Rac et de Cdc42. Ces interactions reflètent les fonctions des protéines parvines qui ne possèdent pas d'activité enzymatique intrinsèque et agissent par leur liaison à leurs différents partenaires (Sepulveda et Wu, 2006). Les parvines sont impliquées dans l'adhésion des cellules et les processus dépendant de l'actine (Legate et al., 2006).

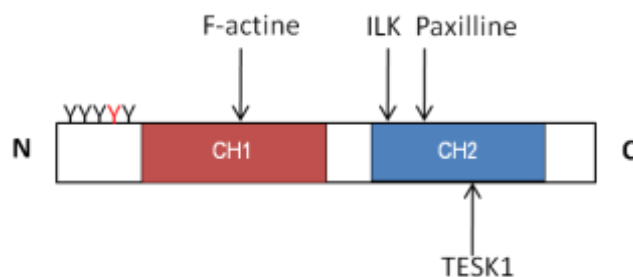


Figure 19. Structure de la protéine α -parvine et sites d'interaction avec ses différents partenaires. Y, serine phosphorylée ; Y, thréonine phosphorylée

b. Le complexe ILK, PINCH et parvine

La protéine ILK

La protéine ILK a été identifiée en 1996 par la technique de double hybride comme une molécule s'associant directement avec la queue cytoplasmique de la $\beta 1$ intégrine (Hannigan et al., 1996). Cette sérine/thréonine kinase est constituée de trois domaines : une région en N-terminal contenant trois répétitions ankyrine, un domaine d'homologie à la pleckstrine PH et un domaine sérine/thréonine kinase en C-terminal contenant des sites de liaison pour les domaines CH. ILK possède de nombreux partenaires moléculaires, notamment des protéines de structure qui lui procurent un lien avec le cytosquelette d'actine. Elle est en interaction directe avec les domaines cytoplasmiques des chaînes $\beta 1$ et $\beta 3$ des intégrines (Hannigan et al., 1996) (Pasquet et al., 2002), et est indirectement connectée aux filaments d'actine par sa liaison avec les parvines α et β . La suppression d'*ILK* diminue de façon significative l'activation des $\beta 1$ et $\beta 3$ intégrines, suggérant sa participation à la voie *inside-out* (Honda et al., 2009). Les interactions d'ILK avec le cytosquelette sont également assurées par sa liaison avec la protéine adaptatrice paxilline, qui interagit avec la F-actine par le biais des protéines α -parvine et vinculine (Turner et al., 1990) (Nikolopoulos et Turner, 2000). De plus, l'étude du modèle *Caenorhabditis elegans* a montré une liaison entre ILK et la protéine orthologue MIG2/kindline-2 qui interagit avec la filamine, établissant une autre connection entre ILK et l'actine.

Plusieurs études rapportent la présence d'une activité catalytique du domaine kinase d'ILK. *In vitro*, la protéine recombinante phosphoryle plusieurs substrats parmi lesquels la $\beta 1$ intégrine (Hannigan et al., 1996), la $\beta 3$ intégrine (Pasquet et al., 2002), Akt et GSK3 β (Persad et al., 2001) (White et al., 2001) (Sakai et al., 2003) (Troussard et al., 2003), les chaînes légères de la myosine (Deng et al., 2001) la β -parvine (Yamaji et al., 2001) et MYPT1 (*myosin-light-chain-phosphatase target subunit-1*) (Murányi et al., 2002). Le point de lecture de l'activité kinase d'ILK le plus couramment utilisé est la phosphorylation d'Akt (Ser 473) et de GSK3 β . Son implication dans la voie de la PI3K fait d'ILK une cible d'intérêt en cancérologie, il a ainsi été démontré qu'ILK est impliquée dans de nombreux événements liés au développement de tumeurs cancéreuses comme la suppression de l'apoptose, la migration et l'invasion tumorale (Yoganathan et al., 2002).

Cependant, aucune preuve de l'activité physiologique d'ILK n'a été faite *in vivo*, et son rôle de kinase est aujourd'hui controversé. Des travaux récents, utilisant des souris KI (*knock-in*), ont montré que des mutations dans le domaine kinase d'ILK n'affectent pas la phosphorylation de ses prétendus substrats (Lange et al., 2009). De plus, Lange *et al.* n'ont pu détecter l'activité kinase *in vitro*, remettant en cause les précédentes et nombreuses études à ce sujet. Les auteurs de ces travaux proposent que l'activité de phosphorylation induite par ILK ne serait pas directe mais réalisée par un ou plusieurs de ses partenaires (Lange et al., 2009) (Wickström et al., 2010).

Les protéines PINCH

PINCH-1 a été découverte en 1994 comme un marqueur de la sénescence des érythrocytes (Rearden, 1994) et une deuxième isoforme nommée PINCH-2 a été caractérisée en 2002 (Zhang et al., 2002a). Les PINCH sont des protéines adaptatrices constituées de cinq domaines LIM (*Lin11*, *Isl-1*, *Mec-3*), elles interagissent toutes deux avec ILK de façon mutuellement exclusive, grâce à leur domaine LIM situé en N-terminal (Zhang et al., 2002a). Les isoformes PINCH-1 et 2 sont co-exprimées dans les cellules et entrent en compétition de liaison pour ILK. La délétion de *PINCH-1* dans les fibroblastes réduit l'étalement et la migration cellulaire. Cependant, la surexpression de PINCH2 dans les cellules *PINCH-1*^{-/-}, ne restaure pas la transduction des signaux contrôlant l'adhésion et la migration. Les différences fonctionnelles observées entre les deux isoformes sont probablement dues à la liaison de PINCH-1 et 2 à des partenaires moléculaires distincts. Ainsi, les protéines accessoires se liant différemment aux protéines PINCH seraient à l'origine de la transduction des signaux contrôlant l'adhésion et la migration (Zhang et al., 2002a). Pour exemple, les protéines RSU1 (*Ras-suppressor protein*) et NCK2 se lient spécifiquement à PINCH-1. Ces deux molécules sont à l'origine de la signalisation croisée des intégrines et des récepteurs tyrosine kinase des facteurs de croissance.

Le complexe IPP

Les études de délétion des molécules des adhésions focales ont permis de distinguer les protéines majeures de la régulation des intégrines. Trois protéines sont ainsi apparues comme particulièrement importantes dans la transduction des signaux médiés par les

intégrines : ILK, PINCH et parvine. Ces molécules forment un complexe tertiaire nommé IPP (ILK-PINCH-Parvine). La kinase ILK est le composant majeur du complexe sur lequel se lient directement PINCH et parvine. Comme pour PINCH-1 et 2, les liaisons des protéines α - et β -parvines sont mutuellement exclusives : la surexpression de la β -parvine inhibe la liaison entre ILK et l' α -parvine (Zhang et al., 2004).

Le complexe IPP se forme dans le cytosol et précède l'adhésion des cellules (Zhang et al., 2002b). Il facilite la localisation des trois protéines aux AF et les stabilise en les protégeant de la dégradation par le protéasome. L'utilisation de siRNA a montré que PINCH-1, ILK et de façon moins importante, l' α -parvine, sont mutuellement dépendantes dans leur maintien : la délétion d'une des protéines du complexe entraîne la dégradation des autres composants (Fukuda et al., 2003). Cependant, cette dégradation est incomplète et laisse penser qu'ILK, PINCH et parvine pourraient avoir des rôles spécifiques indépendants du complexe IPP. Par exemple, PINCH-1 se déplace entre le noyau et le cytoplasme dans les cellules de Schwann et a été trouvé dans le noyau de cellules primitives de l'endoderme de souris. Ces observations indiquent que PINCH-1 pourrait jouer un rôle dans la régulation de gènes ou la signalisation entre cytoplasme et noyau (Campana et al., 2003) (Li et al., 2005a).

Les fonctions biologiques des membres du complexe IPP ont été examinées dans de nombreux types et fonctions cellulaires : l'angiogenèse des cellules endothéliales (Tan et al., 2004), l'agrégation des plaquettes (Pasquet et al., 2002) (Yamaji et al., 2002), la croissance des neurones (Mills et al., 2003) ou l'adhésion des leucocytes (Friedrich et al., 2002). L'ensemble de ces études a montré que les trois protéines ont des rôles communs : elles participent aux AF, forment le lien indispensable entre la MEC et le cytosquelette d'actine, et contribuent à la transduction des signaux extracellulaires (Legate et al., 2006). De plus, elles forment une plateforme indispensable au recrutement d'autres protéines, une étude a ainsi montré le rôle important du complexe IPP dans le contrôle de la maturation et la stabilisation des AF. La délétion des gènes *ILK* et *PINCH-1*, inhibe la maturation des CF en AF en empêchant le recrutement de la tensine (Stanchi et al., 2009).

L'importance physiologique des protéines ILK, PINCH-1 et α -parvine est soutenue par des expériences *in vivo* chez la souris. La délétion des trois gènes est létale bien que les phénotypes des embryons présentent de légères différences confirmant les rôles spécifiques de chacune de ces protéines. Les embryons de souris *PINCH1*^{-/-} et *ILK*^{-/-} s'arrêtent au stade péri-implantatoire du développement embryonnaire, mais les embryons *PINCH1*^{-/-} meurent

entre les jours 6,5-7,5 (Liang et al., 2005) alors que les embryons ILK^{-/-}, comme les embryons β 1 intégrine^{-/-}, meurent entre les jours 5,5-6,5 (Sakai et al., 2003). Les embryons de souris α -parvine^{-/-} se développent plus longtemps et meurent après l'implantation, entre les jours 10,5-11,5. Il n'a pas été déterminé si la survie plus longue des embryons α -parvine^{-/-} est le résultat de la compensation par les autres membres de la famille parvine.

Les travaux de Montanez *et al.* ont montré que les embryons α -parvine^{-/-} souffrent d'un défaut cardiovasculaire sévère (Montanez et al., 2009). Le remodelage vasculaire est anormalement faible et les lits vasculaires sont désorganisés. Les vaisseaux sont peu recouverts par les cellules murales (CML et péricytes). L'étalement cellulaire, la polarité ainsi que la migration orientée des CML sont diminués. Ces anomalies résultent de l'augmentation de l'activité de RhoA/ROCK qui entraîne une élévation de la phosphorylation des MLC et une contraction non contrôlée des CML. Ces observations sont en accord avec les études précédentes rapportant que la β 1 intégrine, ILK et l' α -parvine ont des fonctions essentielles dans le développement du coeur, dans la contraction et l'intégrité des myocytes de différents organismes modèles (Fässler et al., 1996) (Chen et al., 2005) (Bendig et al., 2006). Au contraire, les embryons de souris PINCH1^{-/-} n'ont montré aucune anomalie cardiaque qu'elle soit fonctionnelle ou histologique (Liang et al., 2005). ILK participe activement au développement du système vasculaire (Friedrich et al., 2004) mais le degré de coopération entre ILK et α -parvine dans ce phénomène n'a pour le moment pas été défini.

Il est à noter que l'existence de plusieurs isoformes pour la parvine et PINCH ainsi que l'interdépendance des composants du complexe IPP, rendent souvent l'interprétation des résultats difficile. Les rôles spécifiques, joués par chacun des membres du complexe, restent à caractériser.

c. L'interaction α -parvine et TESK1

Récemment, Lalonde *et al.* ont identifié une nouvelle protéine partenaire de l' α -parvine nommée TESK1 (*testicular protein kinase 1*) (LaLonde et al., 2005). La kinase TESK1 régule l'assemblage des AF ainsi que l'organisation de l'actine par la phosphorylation de la cofiline. Celle-ci est connue pour contrôler la dynamique du cytosquelette par son activité de coupure et de dépolymérisation des filaments d'actine. La phosphorylation de la cofiline sur la sérine 3 diminue son activité en inhibant sa fixation à l'actine. Dans cette étude, il a été montré que l'association de l' α -parvine avec TESK1 entraîne l'inhibition de son activité

kinase et par conséquent, la diminution de la phosphorylation de la cofiline. De plus, au cours de l'adhésion des cellules HeLa, cette association est négativement régulée par la phosphorylation de l' α -parvine. Dans le modèle proposé par les auteurs, l'activation des intégrines par l'adhésion à la MEC, entraîne la phosphorylation de l' α -parvine qui se dissocie de TESK1. La kinase TESK1 libre phosphoryle alors la cofiline et bloque ainsi son activité. La diminution de l'activité de dépolymérisation des filaments d'actine permet l'étalement de la cellule par la stabilisation des extensions membranaires. Ainsi, l'association de TESK1 et de l' α -parvine serait un mécanisme de régulation de l'adhésion et de l'étalement des cellules par la modulation de l'activité de la cofiline (Figure 20) (LaLonde et al., 2005). Cette étude confirme les résultats de Zhang *et al.* qui ont observé que la suppression de l' α -parvine par RNAi provoque l'augmentation de l'adhésion et de l'étalement des cellules HeLa (Zhang et al., 2004).

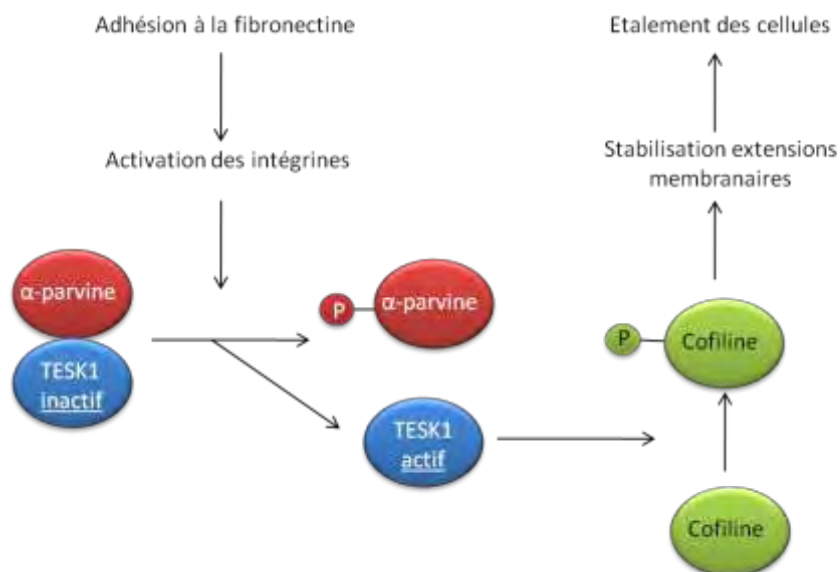


Figure 20. Modèle de la régulation de l'adhésion par l' α -parvine et TESK1

D'après (LaLonde et al., 2005)

d. Le rôle fonctionnel de la phosphorylation de l' α -parvine

L' α -parvine possède en N-terminal des sites de phosphorylation pour des sérine/thréonine kinases, comme ERK et Cdc2. La kinase Cdc2, en combinaison avec la cycline B1, peut phosphoryler *in vitro* les sérines S4, S8, S14 et S19 de l' α -parvine. Ces

résultats rendent probables la participation de l' α -parvine dans la régulation du cytosquelette d'actine lors de la mitose (Curtis et al., 2002).

Mais la phosphorylation de l' α -parvine augmente également lors de l'adhésion et l'étalement des cellules. Cette phosphorylation semble être liée à l'activité de ERK, recrutée au niveau des AF par la paxilline (Clarke et al., 2004). Un mutant de l' α -parvine, présentant des mutations aux cinq sites de phosphorylation, a été utilisé comme dominant négatif. La transfection de ce mutant, inhibe l'étalement et la motilité de cellules U2OS et augmente la formation des fibres de stress (Clarke et al., 2004). Dans les podocytes du rein, la surexpression d'une forme mutée de l' α -parvine, dans laquelle les sites de phosphorylation ont été délétés, diminue l'association avec ILK et inhibe l'adhésion, l'étalement mais aussi la survie des cellules podocytaires (Yang et al., 2005). Ces différentes études montrent que la phosphorylation de l' α -parvine est une étape clé dans la régulation des fonctions de cette protéine. De même, son interaction avec TESK1 est régulée par sa phosphorylation. Lorsqu'elle n'est pas phosphorylée, l' α -parvine s'associe avec TESK1 et inhibe son activité. La phosphorylation de l' α -parvine par ERK, libère TESK1 et active indirectement l'étalement des cellules (LaLonde et al., 2005).

Lalonde *et al.* ont observé qu'ILK n'est pas co-immunoprécipitée avec TESK1 (LaLonde et al., 2005). Ce résultat laisse penser que les associations de l' α -parvine avec ILK ou TESK1 ne peuvent avoir lieu en même temps et seraient mutuellement exclusives. La phosphorylation de l' α -parvine, qui permet son association avec ILK et PINCH (Yang et al., 2005), entrainerait en parallèle la libération de TESK1. Suivant son état de phosphorylation, l' α -parvine s'associerait avec différents partenaires moléculaires et contrôlerait ainsi plusieurs voies de signalisation. La régulation par une simple phosphorylation, faciliterait la coordination des processus complexes et dynamiques que sont l'adhésion et la migration cellulaire.

L'ensemble de ces travaux montre que l' α -parvine joue un rôle important dans les processus d'adhésion, d'étalement cellulaire, de migration et de survie. Ces fonctions sont régulées par sa capacité à se lier avec ses partenaires moléculaires : ILK, la paxilline, TESK1 ou l'actine. Enfin, la phosphorylation est une étape clé qui régule les interactions et ainsi l'activité de l' α -parvine.

III. Le cytosquelette d'actine et la migration cellulaire

La protéine d'actine forme des filaments qui procurent à la cellule une architecture mécanique lui permettant d'exercer des forces spatialement et temporellement contrôlées, nécessaires à des processus variés tels que la migration, la division ou l'internalisation de molécules. Dans cette partie, nous nous intéresserons plus particulièrement à la migration cellulaire, ce phénomène requiert la participation et la coordination des intégrines, des adhésions focales ainsi que du cytosquelette d'actine (Figure 23).

1. L'organisation de l'actine

L'actine représente approximativement 5 à 15% du nombre total de protéines présentes dans les cellules endothéliales (Patterson et Lum, 2001). Le cytosquelette d'actine est une structure extrêmement dynamique, formée d'un réseau de filaments d'actine (F-actine) qui se polymérisent et dépolymérisent en fonction de la demande cellulaire. L'actine monomérique (G-actine) s'assemble et forme une structure hélicoïdale double, la F-actine. La polymérisation de l'actine est constituée de deux processus successifs : la nucléation et l'élongation. La nucléation est l'assemblage de dimère ou de trimère de G-actine en une structure géométrique qui fournit un site pour l'élongation, où les monomères d'actine, liés à une molécule d'ATP, s'ajoutent un à un pour former un filament (Wegner et Engel, 1975) (Figure 21). Les filaments d'actine s'allongent rapidement à l'extrémité dite barbée (+) et lentement à l'extrémité dite pointue (-). Ce déséquilibre permet la croissance permanente du filament du côté barbé et fait du filament d'actine une structure polarisée (Tilney et Kallenbach, 1979). Dans les cellules, la formation spontanée de F-actine est un processus dynamiquement défavorable, c'est pourquoi les cellules ont recours à des protéines, appelées facteurs de nucléation, telles que le complexe Arp2/3, les formines, et la protéine Spire (Figure 21) (Pollard et al., 2000). La famille des protéines WASP (*wiskott-aldrich syndrome protein*) et WAVE (*WASP family verprolin-homologous protein*) participent également au phénomène de nucléation en activant le complexe Arp2/3 (pour revue (Takenawa et Suetsugu, 2007)).

La dépolymérisation de l'actine est due à l'hydrolyse de la molécule d'ATP en ADP qui entraîne une perte d'affinité entre les monomères (pour revue (Prasain et Stevens, 2009)).

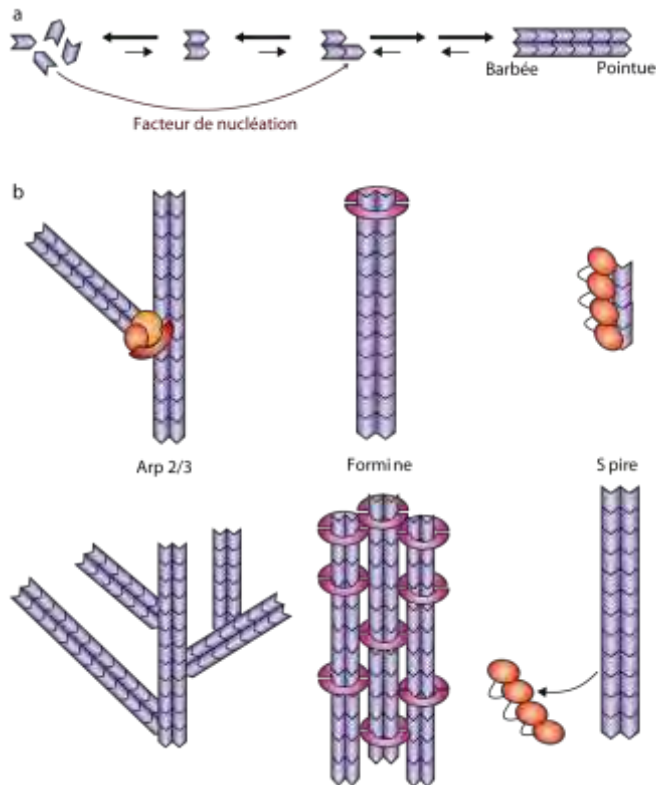


Figure 21. Polymérisation de l'actine et facteurs de nucléation. a, dimérisation et trimérisation des monomères d'actine, suivi de l'élongation du filament polarisé. b, Le complexe Arp 2/3 permet la nucléation d'un nouveau filament, en partant d'un côté du filament pré-existant (branchement 70°). La formine aide à la nucléation d'un filament et bouge progressivement avec l'extrémité barbée durant l'élongation. La protéine Spire participe à la nucléation en stabilisant des tétramères d'actine. D'après (Chhabra et Higgs, 2007)

La F-actine forme un réseau associé à la membrane ainsi qu'un réseau sous membranaire (cortical) mais peut également s'organiser en fibre de stress. Dans ce cas, les filaments sont courts et couplés à la myosine pour former un réseau contractile d'actomyosine. Les fibres de stress s'allongent dans le cytosol et interagissent avec les adhésions focales (Naumanen et al., 2008).

2. Les rôles de la F-actine dans le processus de migration

La migration des cellules endothéliales est impliquée dans de nombreux processus physiologiques ou pathologiques, comme l'embryogenèse, la cicatrisation, l'artériosclérose ou l'angiogenèse tumorale. On distingue trois types de mécanismes : la chimiotaxie, une migration orientée induite par un gradient de molécules chimioattractantes solubles ; l'haptotaxie, une migration orientée par un gradient de protéines d'adhésion fixées dans la matrice extracellulaire ; la mécanotaxie correspondant à une migration induite par les forces de tension mécaniques (forces de cisaillement) (Li et al., 2005b).

La migration comporte plusieurs étapes qui se répètent de façon cyclique. L'ensemble de cette dynamique est le résultat d'une organisation hautement régulée et coordonnée.

Pour migrer, une cellule doit acquérir dans un premier temps une morphologie polarisée en réponse aux signaux extracellulaires. Cette étape se traduit par la formation d'un front de migration, accompagnée de la redistribution des récepteurs de la MEC comme les intégrines (Schmidt et al., 1993). Les filaments d'actine sont relocalisés du cortex cellulaire vers le front de migration (Coates et al., 1992). Puis, la cellule étend des protubérances membranaires dans la direction de la migration. Ces extensions sont formées par l'assemblage de monomères d'actine qui pousse la membrane vers l'avant. La cellule est ainsi capable de former une excroissance plate et large, appelée lamellipode (Theriot et Mitchison, 1991), ou de fines extensions en forme de pointes, nommées filopodes (Mallavarapu et Mitchison, 1999) (Figure 22). L'observation microscopique de cellules vivantes a montré que les adhésions précoces et les complexes focaux se forment à l'avant du lamellipode (Giannone et al., 2007), se développent puis mûrissent durant le mouvement du lamellipode, en adhésions focales, directement connectées aux fibres de stress. Ainsi, la formation des nouvelles adhésions aux extrémités du lamellipode permet son ancrage à la MEC et la traction de la cellule. Parallèlement, les adhésions présentes à l'arrière de la cellule se désassemblent et la contraction de l'actomyosine entraîne la rétraction de la cellule vers l'avant. Le processus de migration peut ainsi se poursuivre par l'initiation d'un nouveau cycle (extension d'un lamellipode, attachement, traction).

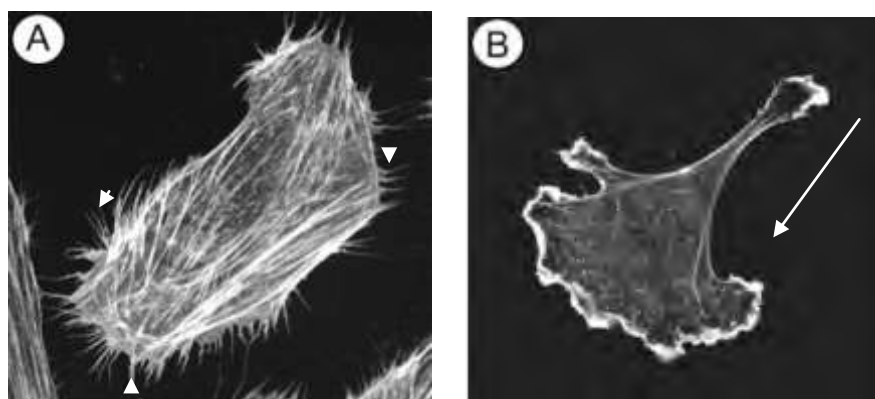


Figure 22. Structures d'actine impliquées dans la migration endothéliale (HUVEC). A, Les filopodes sont de fines projections contenant des filaments parallèles d'actine. Ces structures servent de détecteurs de stimuli migratoires. B, Le lamellipode est une extension membranaire formée d'un réseau dense d'actine, il permet la traction de la cellule vers l'avant, la flèche indique le sens de la migration. (Lamallice et al., 2007)

a. Le lamellipode

Le lamellipode se définit comme une protrusion cellulaire plate, formée d'une fine couche cytoplasmique attachée à la matrice. Il est constitué d'un réseau branché bidimensionnel d'actine (Small et al., 2002) et observé lors de la migration et de l'étalement cellulaire. Dans une série de papiers, Abercrombie *et al.* ont pu distinguer et définir deux régions distinctes présentes au front de migration : le lamellipode et la lamella (Figure 23) (Abercrombie et al., 1971) (Abercrombie et al., 1977). Le lamellipode est plus distal, commençant à l'avant de la cellule sur une distance de quelques micromètres, il présente un réseau d'actine dense. La lamella s'étend du lamellipode jusqu'au corps de la cellule et est enrichie en tropomyosine et en myosine II (DesMarais et al., 2002) (Svitkina et al., 1997). L'observation au microscope électronique de la lamella, a montré un réseau d'actine plus relâché, associé aux microtubules et aux filaments intermédiaires. La lamella est caractérisée par un turnover lent de l'actine et un faible nombre de branchements (Svitkina et Borisy, 1999). La microinjection d'actine fluorescente a permis une analyse précise de la dynamique du lamellipode, et a montré que les filaments d'actine polymérisent rapidement sur le bord avant de la cellule, en direction du mouvement, et se dépolymérisent à l'arrière, dans un processus nommé *treadmilling* (Wang, 1985). Le contrôle de la dépolymérisation de l'actine à l'extrémité pointue et de la polymérisation à l'extrémité barbée, détermine la force protrusive qui pousse la membrane formant le lamellipode. La nucléation de l'actine pure est trop lente pour permettre une locomotion rapide des cellules, c'est pourquoi des protéines liant l'actine accélèrent le cycle du *treadmilling*. Parmi celles-ci, on peut citer la cofiline qui, paradoxalement, accélère la vitesse du *treadmilling* en augmentant la dépolymérisation de l'actine (Carlier et al., 1997). Comme précédemment décrit, cette protéine a la propriété de changer la structure du filament d'actine et d'augmenter sa dépolymérisation à l'extrémité pointue. Selon les conditions (ratio cofiline/actine et concentration en phosphate), ce phénomène peut avoir pour conséquence l'augmentation du nombre de G-actine et la croissance plus rapide de l'extrémité barbée. La protéine profiline contribue également à l'augmentation du rythme du *treadmilling*. En se liant à l'actine, la profiline forme un complexe profiline-actine capable de s'assembler uniquement aux extrémités barbées (Yarmola et Bubb, 2006). Enfin, les protéines de coiffe (*capping protein*) se fixent et bloquent les extrémités barbées de certains filaments, afin d'accélérer la vitesse de nucléation des rares extrémités barbées non coiffées (Schafer et al., 1996).

b. Le filopode

Les filopodes sont définis comme de fines structures protrusives dont l'épaisseur ne dépasse pas 200nm de diamètre. Elles contiennent des faisceaux parallèles de 10 à 20 filaments d'actine regroupés en câbles. Les filopodes « explorent » l'environnement et détectent les stimuli migratoires. Ils participent à l'orientation de la membrane (DeRosier et Tilney, 2000) et sont capables d'initier la nucléation des lamellipodes (Guillou et al., 2008). L'extension et la rétraction de ces structures sont contrôlées par l'assemblage de l'actine qui implique des facteurs moléculaires et des mécanismes d'association différents des lamellipodes. Les filaments d'actine s'allongent à l'extrémité barbée en contact avec la membrane, mais ne forment pas de branchement. Les filaments sont soutenus par des protéines comme la fascine, qui maintiennent la rigidité des faisceaux, facilitant l'extension membranaire (Vignjevic et al., 2006). Les protéines Ena/VASP (*enable/vasodilatator-stimulated phosphoprotein*) présentes à la pointe du filopode, permettent la dissociation des protéines de coiffe des extrémités barbées (Bear et al., 2002). Il a été observé que la diminution de l'expression des protéines de coiffe entraîne la formation de filopodes (Mejillano et al., 2004). Ces protéines favoriseraient donc l'extension du filopode en protégeant les extrémités des filaments. Lors de la formation des filopodes, les protéines Ena/VASP regroupent également les filaments en câbles et participent ainsi à leur stabilisation (Applewhite et al., 2007). La protéine formine mDia2, quant à elle, est un effecteur des petites GTPase Rho et catalyse la formation du complexe profiline-actine. Elle aide ainsi à la nucléation et l'élongation de filaments d'actine parallèles.

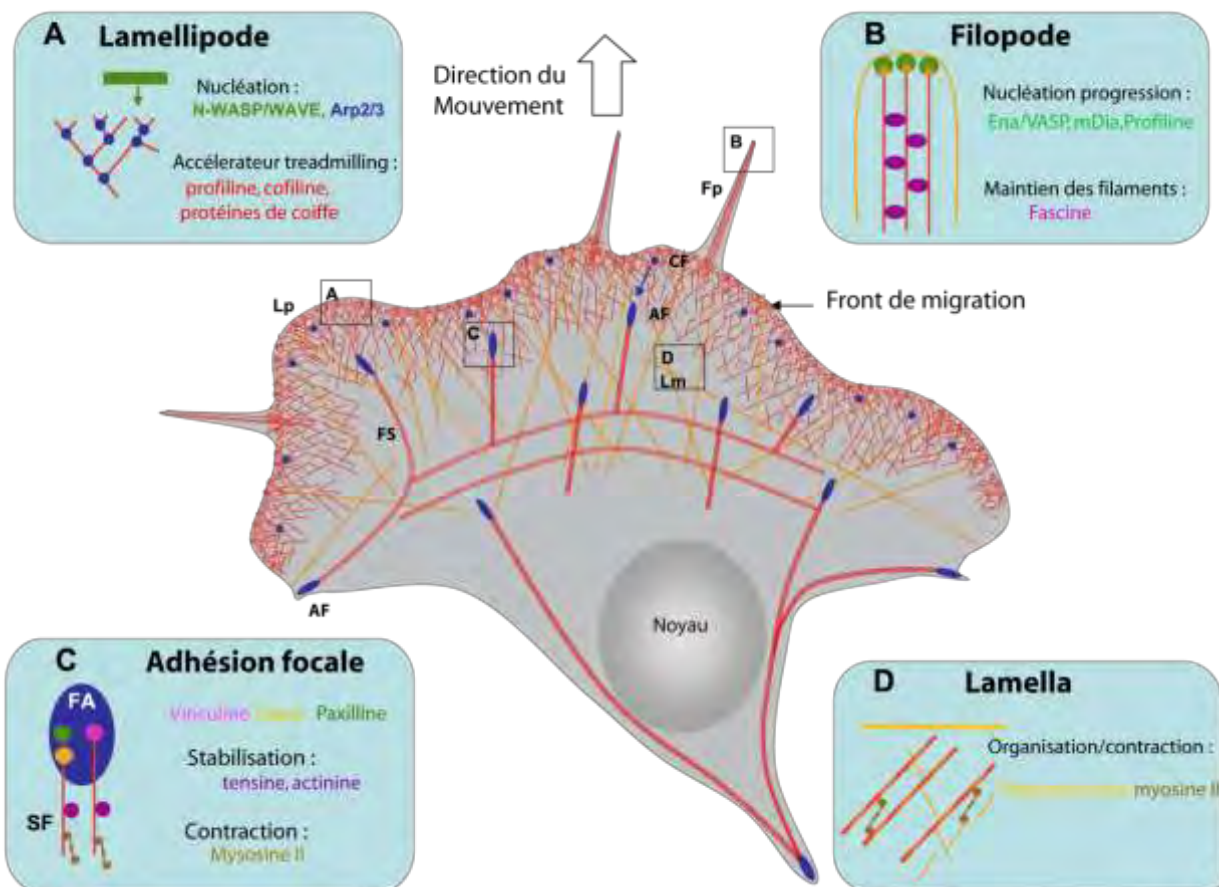


Figure 23. Schéma représentant le cytosquelette d'actine dans une cellule en migration. Cette cellule schématisée contient les structures majeures trouvées dans une cellule en migration. A. Dans le lamellipode, un réseau branché d'actine est généré à la membrane plasmique par les protéines WASP-Arp2/3 et les protéines régulatrices accélérant le *treadmilling* comme la profiline, la cofiline ou les protéines de coiffe. B. Lors de la migration, les cellules émettent des protrusions fines en forme de doigts, les filopodes, capables «d'explorer» l'environnement. A l'extrémité du filopode, on trouve des protéines comme Ena/VASP, qui favorise la nucléation, ou la protéine formine mDia2 qui catalyse la formation du complexe profiline-actine. Les filaments d'actine non branchés sont maintenus par la fascine. C. Les adhésions focales connectent le cytosquelette d'actine à la MEC. Au bord du lamellipode, se forment les complexes focaux qui mûrissent progressivement en adhésions focales. Les adhésions permettent l'ancrage du lamellipode et la traction de la cellule vers l'avant. D. La lamella est caractérisée par un *turnover* lent de l'actine et la présence de protéines spécifiques comme la tropomyosine et la myosine II. Lp, lamellipode ; Fp, filopode ; Lm, lamella ; FS, fibre de stress ; AF, adhésion focale ; CF, complexe focaux. D'après (Le Clainche et Carlier, 2008)

Article 1 : Lnk est un régulateur de la voie des intégrines dans les CE et module l'adhésion et la migration cellulaires par son action sur l' α -parvine

Résumé de l'article :

Lnk (SH2B3) appartient à une famille de protéines adaptatrices avec APS et SH2B1. Ces protéines régulent les voies de signalisation des facteurs de croissance et des cytokines impliquées dans l'homéostasie des cellules hématopoïétiques. Nos précédents travaux ont montré la régulation de Lnk dans les cellules endothéliales humaines lors d'une stimulation par du TNF- α et son rôle dans le rétrocontrôle de l'inflammation (Fitau et al., 2006).

Cette étude s'est attachée à préciser les fonctions de Lnk dans les processus cellulaires associées à la signalisation des intégrines : l'adhésion, la survie et la migration endothéliales. Nos résultats montrent que l'activation de la voie la sous-unité $\beta 1$ des intégrines induit une phosphorylation rapide de Lnk. Au contraire, l'utilisation de CE de souris Lnk^{-/-} indique que la suppression de Lnk inhibe l'activité de la voie de la $\beta 1$ intégrine qui est reflétée par l'absence de phosphorylation des kinases Akt et GSK3 β . Ces résultats supportent l'hypothèse du rôle de Lnk dans le contrôle et l'activation de la voie des intégrines. De plus, nous avons démontré que la surexpression de Lnk entraîne une augmentation du nombre et de la densité des adhésions focales dans les CE, qui s'accompagne d'une phosphorylation importante des protéines FAK et paxilline. Le marquage de la F-actine a révélé un accroissement du nombre de fibres de stress et une modification de la morphologie cellulaire. Ces modifications phénotypiques ont des conséquences fonctionnelles : la vitesse d'adhésion et l'étalement des CE sont augmentés alors que la migration endothéliale et l'anoïkis sont diminuées. Nous avons prouvé que Lnk protège les CE de l'anoïkis par un mécanisme dépendant de la PI3K. L'inhibition de la migration cellulaire est en partie due à la diminution de l'expression de l' α -parvine. Nous proposons un modèle dans lequel une forte expression de Lnk favorise la formation d'un complexe ILK-Lnk au dépens de la liaison ILK- α -parvine, conduisant à la dégradation de l' α -parvine.

L'ensemble de ces résultats présente de nouvelles fonctions régulatrices pour Lnk dans le contrôle de l'adhésion, la survie et la migration endothéliales.

Lnk is a key regulator of β integrin signaling in endothelial cells and targets α -parvin to control cell adhesion and migration

Running Title: Lnk signaling adaptor controls endothelial migration

Julie Devallière¹, Juliette Fitau¹, Mathias Chatelais¹, Nathalie Gerard¹, Laura Velasquez², Christopher E. Turner³ and Béatrice Charreau¹.

¹INSERM, UMR643, Nantes, France; ITERT, Institut de Transplantation Et de Recherche en Transplantation, CHU Nantes, France; Université de Nantes, Faculté de Médecine, Nantes, France.

²INSERM, UMR978, Université de Paris 13, Bobigny, France.

³Department of Cell Biology and Developmental Biology, State University of New York Upstate Medical University, Syracuse, NY 13210

Address correspondence to Dr. B. Charreau, PhD, INSERM UMR643, CHU Hôtel Dieu, 30 Bd Jean Monnet, 44093 Nantes cedex 01, France.

Tel: +33 240 087 416.

Fax: +33 240 087 411.

E-mail: Béatrice.Charreau@univ-nantes.fr

Abstract

Lnk (Src homology 2-B3) along with APS and SH2-B belongs to a family of SH2-containing proteins with important adaptor functions. Lnk regulates growth factor and cytokine receptor-mediated pathways implicated in hematopoietic cell homeostasis. We previously showed that Lnk is expressed in endothelial cells (ECs) and established Lnk as a negative regulator of TNF signaling. In this study, we show that integrin ligation, using anti- β 1 integrin Abs, also promotes Lnk activation in human ECs whereas β 1 integrin ligation on EC from *Lnk*^{-/-} mice failed to activate integrin-mediated signal transduction *via* Akt and GSK3 β phosphorylation. Using an adenoviral gene transfer approach, we found that Lnk induces the phosphorylation of FAK and paxillin and we identified ILK as a new molecular partner for Lnk. Lnk expression also results in cytoskeleton reorganization with morphological changes and increases both the number and density of focal adhesions. Functionally, sustained Lnk expression dramatically increases EC adhesion to extracellular matrix, inhibits EC migration in wound healing assays and apoptosis induced by anoikis. Finally, Lnk decreases significantly the expression of α -parvin that we identified as the molecular target impairing EC migration. Collectively, our results identify the adaptor Lnk as a novel and effective key regulator of integrin-mediated signaling controlling EC adhesion and migration, both critical in vascular remodeling and regeneration.

Introduction

The loss of endothelial function and integrity initiates a cascade of events that may lead to atherosclerosis, vein graft atherosclerosis, restenosis after percutaneous revascularization, and transplant arteriosclerosis (TA) (1). TA, characterized by diffuse and concentric intimal thickening in blood vessels of the transplanted organ, is the major cause of graft failure after the first year of transplantation (2). Endothelial cell (EC) activation and damage are the main factors in TA leading to chronic rejection (3) (4). Intimal hyperplasia and extracellular matrix (ECM) accumulation in allografts occur as a consequence of endothelial injury and dysfunction caused by both immunologic and nonimmunologic factors (2) (1). The migration of ECs is critical in vascular remodeling and regeneration. EC migration is a mechanically integrated molecular process that involves dynamic, coordinated changes in cell adhesion with a dynamic reorganization of cell-matrix adhesions, cytoskeleton organization, and signal transduction (5) (6).

Integrins participate in many aspects of immunologic and inflammatory responses, especially those involving cell migration, adhesion, and activation. Integrin ligation promotes integrin clustering and subsequent integrin-mediated intracellular signal transduction. Unlike growth factor receptors, integrins have short cytoplasmic tails but no intrinsic enzymatic activities. To integrate signals and activate intracellular signaling pathways, integrins co-cluster with serine, threonine and tyrosine kinases, phosphatases and adaptor proteins in large multiprotein complexes referred to cell-matrix adhesions. These complexes connect integrins with the actin cytoskeleton and enable extracellular signals transduction that regulates adhesion, motility, proliferation and survival (7). Several types of cell-matrix adhesions are described in adherent cells, and classified according to their structure and size. Among them, focal adhesions (FA) are comprised of integrins, protein kinases such as focal adhesion kinase (FAK) and Src, adaptor proteins such as Shc, actin binding cytoskeletal proteins such as talin, paxillin, tensin and vinculin and signaling intermediates such as Rho family GTPases.

Lnk (SH2-B3) belongs with the closely related proteins APS and SH2-B to a subfamily of SH2-containing proteins with potential adaptor functions (8) (9) (10). Substantial data established that these adaptor proteins are regulators of growth factor and cytokine receptor-mediated pathways (11) (12). Lnk protein contains a NH₂-terminal proline rich region, a pleckstrin homology (PH) domain, a Src homology 2 (SH2) domain, and potential tyrosine phosphorylation sites. *Lnk*^{-/-} mice display an abnormal accumulation of erythroid cells,

megakaryocytes, and B lymphocytes in the different hematopoietic compartments, indicating a defect in lymphoid and myeloid homeostasis (13). Lnk negatively regulates stem cell factor (SCF) and c-Kit receptor signaling in B cell precursors (13) (14) (15), hematopoietic cells (16) (17), endothelial progenitor cells (18) (19) and mast cells (20) (12). Lnk deficiency causes increased signaling through cytokine receptors that are critical for growth of HSCs/HPCs such as c-Kit and thrombopoietin (TPO) receptor, c-mpl (13) (21) (22) (23).

We previously reported that the Lnk adaptor is expressed in vascular ECs where it is rapidly phosphorylated and subsequently upregulated by the proinflammatory cytokine TNF (24) (25). Our findings also demonstrated that Lnk downregulates expression of cellular adhesion molecules (E-Selectin and VCAM-1) in activated vascular ECs *via* negative control on the TNF signaling pathway involving both the PI3K and the ERK1/2 MAPK (25). The present study further examines the signaling events triggered by Lnk in the endothelium. Our findings demonstrate that the Lnk adaptor is an effective regulator of the integrin-mediated signaling pathway that impact on EC adhesion, migration and survival processes. Our results also identify the ILK and α -parvin proteins as new molecular partner and target, respectively, of the Lnk adaptor thus providing an additional mechanism for Lnk-mediated regulatory functions in ECs.

Experimental Procedures

Reagents and antibodies- LY294002 (10 μ M) and Wortmannin (100nM) inhibitors were purchased from Sigma-Aldrich (Lyon, France). Mouse monoclonal anti- β 1 Integrin (CD29, clone TS2/16) was purchased from Pierce (Rockford, USA). Goat polyclonal anti-Lnk antibody was obtained from Serotec (Cergy St Christophe, France) (1:500 dilution). Rabbit polyclonal antibodies directed against total and phosphorylated forms of Akt (at Ser473), GSK3 β (at Ser9), paxillin (Tyr118), FAK (Tyr925), and total forms of α -parvin and ILK1 were purchased from Cell Signaling Technology (CST, Ozyme, St Quentin Yveline, France) (1:1000 dilution). Mouse monoclonal vinculin and PINCH-1 antibodies were obtained from Sigma-Aldrich. Anti-phosphotyrosine antibody (clone 4G10) was purchased from Upstate Biotechnology (Euromedex, Mundolsheim, France). Mouse anti-GAPDH antibody from Chemicon (Temecula, USA) and mouse anti-tubulin antibody from Oncogene (Merk EuroLab, Val de Fontenay, France) were used to quantify total protein (1:1000 dilution). Horseradish peroxidase conjugated anti-mouse (1:2000 dilution), anti-rabbit (1:1000 dilution) (both from CST) and anti-goat (1:500 dilution) (from Serotec) IgG antibodies were used as secondary antibodies.

Endothelial Cell Isolation, Culture and Activation- Human ECs were isolated from umbilical veins (HUVECs) or renal arteries (HAECs) and grown in early passages (2-6) as we previously described (26). ECs were cultured in endothelial basal growth medium (ECBM, Promocell, Heidelberg, Germany) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), 0.4% EC growth supplement/heparin, hydrocortisone (1 μ g/ml), human basic fibroblast growth factor (1 ng/ml), human epidermal growth factor (0.1 ng/ml), 100 U/ml penicillin (Gibco, Cergy Pontoise, France) and 0.1 mg/ml streptomycin (Gibco) at 37 °C in a 5% CO₂ humidified air incubator. Mouse ECs were isolated from heart of wild-type (WT) or *Lnk*^{-/-} 129SV mice previously described (13). The hearts were dissected and rinsed several times in cold MCDB 105 medium (Sigma-Aldrich). Five hearts were pooled together, chopped and digested in collagenase A (2.2 U/ml, Roche, Meyland, France) for 45 min at 37 °C. The cellular digests were filtered through a cell strainer 70 μ m and washed with cold medium. Cells were then incubated on ice with rat anti-CD31 antibody (BD Biosciences Pharmingen, San Jose, USA) for 30 min. After three washes, goat anti-rat IgG microbeads (Miltenyi Biotec, Paris, France) were added on pellet and cells were sorted using MACS[®] cell separation column (Miltenyi

Biotech). ECs were plated into a single well of a 24-well plate (Corning, Avon, France) pre-coated with 2% gelatin and grown in MCDB 105 medium supplemented with 20% FCS, 2mM L-Glutamine, 1mM sodium pyruvate (Gibco), 1% nonessential amino acids (Gibco), 100 U/ml penicillin and 0.1 mg/ml streptomycin at 37 °C in a 5% CO₂ humidified air incubator. Cells were progressively passed to larger plates, maintained and propagated in 1% gelatin-coated 80mm dishes. Before activation, confluent EC monolayers were maintained for 48 h in ECBM for human cells or MCDB 105 medium for mouse cells supplemented with only 2% FCS before incubation with 10 µg/ml of anti-CD29 (from 15 to 45 min).

Generation of Recombinant Adenoviral Vector Encoding Human Lnk- The recombinant adenovirus AdLnk was produced in the human embryonic kidney 293 cells by the vector core laboratory of the University Hospital of Nantes (INSERM UMR649 Gene Therapy Laboratory, Nantes, France) as we previously described (25). The recombinant adenovirus AdTrack-GFP was used as a control (AdGFP). HAECs were cultured in six-well plates at 70% confluence and infected with a multiplicity of infection from 5 to 200 infectious particle/cell for AdLnk and AdGFP. Adenoviral infection was carried out in ECBM supplemented with 1% FCS at 37 °C, 5% CO₂ under agitation. The cells were washed with medium containing 10% FCS and grown in fresh supplemented ECBM. The expressions of GFP and Lnk were measured 24 h after infection.

siRNA and Transfections- The 21 nucleotide synthetic siRNA duplexes were prepared by Ambion (Applied Biosystems, Austin, USA). In preliminary experiments, we screened siRNAs for their effects on suppression of α -parvin expression. We found that two siRNAs, 5'AAAGAAUCAUUGUGAAAGAtt 3' (ID#s224386 named PARVA1) and 5' GCAUCAAGUGGAAUGUGGAtt 3' (ID#132367 named PARVA2) effectively mediate the silencing of α -parvin expression (specific expression knockdown > 70%). The day before transfection, ECs were seeded at densities of 1.5×10^5 cells/well in six-well plates. ECs were transfected with siRNAs that specially target α -parvin or with a 21-nucleotide irrelevant RNA duplex as a control, using LipofectamineTM RNAiMax (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) at a final concentration of 25nM. The cells were analyzed 48h after transfection by western blot.

HUVECs were used for plasmid transfection experiments. Transfections were performed using LipofectamineTM Reagent in combination with PLUS[®] (Invitrogen) and Xpress-tagged WT and five point mutant (Quint) α -parvin constructs previously described (27) (28).

Immunofluorescence and Image Analysis- For immunofluorescence, ECs were grown to confluence on glass coverslips. After treatment, cultures were washed with PBS, fixed for 10 min in PBS containing 1% paraformaldehyde and permeabilized with Tris buffer saline (TBS) containing 4% bovine serum albumin (Sigma-Aldrich) and 0.01% Tween 20 (Sigma-Aldrich) for 20 min. Cells were washed again with PBS, blocked with 10% donkey or goat serum diluted in TBS-4% BSA-0,1% Tween 20 for 1 h. Cells were then incubated with anti-vinculin (1:400 dilution) antibodies overnight at 4°C. Slides were rewashed and incubated for 1h with goat anti-mouse AlexaFluor[®] 568, or goat anti-mouse AlexaFluor[®] 647 (1:500 dilution) (Invitrogen) depending on experiments. DAPI (1:30000 dilution) (Invitrogen) was used for nuclear staining and Phalloidin-TRITC (1:1000 dilution) (Sigma-Aldrich) for F-actin labeling. Finally, slides were washed in PBS containing 1% BSA, and mounted with ProLong antifade reagent (Molecular Probes, Eugene, OR). Specimens were examined by immunofluorescence microscopy using a Nikon Diaphot microscope (Nikon, Japan). Image acquisition, processing and analysis were performed using MetaMorph[™] Imaging software. Scaled images acquired from noninfected or transduced cells were thresholded in order to define items corresponding to focal adhesions (FAs). A filter (0.5 μ m) was applied to discard background noise. Then, filtered FAs were counted, and the number of FAs was divided by the cell surface area to obtain the density of FAs.

Cell Lysis, Immunoprecipitation and Western Blot Analysis- Cell lysis was performed on ice in 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, and 1% Nonidet P-40 diluted in PBS in the presence of the following protease inhibitors (4-(2-aminoethyl)benzenesulfonyl fluoride (AEBSF), E-64, bestatin, leupeptin, aprotinin, and sodium EDTA (Protease Inhibitor Cocktail, Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France). Protein concentration was determined using BCA protein assay reagent (Pierce, Rockford, IL). Immunoprecipitation (IP) assays were performed using Dynabeads[®] protein A (Invitrogen). Cell lysates were incubated overnight at 4°C with protein A and 10 μ g of anti-Lnk or anti- α -parvin antibodies according to the manufacturer's protocol. Cell lysates and IP were resolved by SDS-PAGE (10%) and proteins were transferred to nitrocellulose membranes (ECL Hybond[™]; Amersham, UK) using a Trans-Blot SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad). Then, membranes were subjected to immunoblot analysis using the primary antibodies described above and appropriate peroxidase-conjugated secondary antibodies. Antibody-bound proteins were detected using an enhanced chemiluminescence kit (ECL, Amersham) and luminescent image analyzer LAS-4000 (Fujifilm, Tokyo, Japan). Image analysis and blot quantification was performed with Multi

Gauge software (Fujifilm). Results shown are representative of at least three independent experiments.

Migration assays- Cells were plated in 24-well plates and grown until confluence in complete medium. The monolayers were then wounded by scratching with a 10- μ l pipette tip (VWR, Fontenay sous bois, France), and detached cells were removed by washing with medium. The cells were incubated in complete ECBM medium and observed using a microscope DMI6000B (Leica Microsystem SAS., Rueil Malmaison, France) equipped with an objective lens X40 (HCX FL plan) for the indicated time. Images of three different segments of the cell-free area were recorded with a CCD camera (Coolsnap HQ2, Photometrics Roper Scientifics SAS Evry, France), and migration distance of individual cells from the front in the three different segments of the wound were measured using MetaMorph™ Imaging software.

Adhesion assays- Cells were seeded (2×10^4 cells/well) in 96-well plates pre-coated with 1% gelatin and medium was removed 30, 40, 50 or 60 min after seeding in order to remove non adherent cells. Medium was replaced by 100 μ l MTT per well (1 mg/ml) diluted in complete medium and cells were incubated at 37 °C for 4 h. Then MTT solution was replaced by DMSO (100 μ l /per well) and optical density (OD) was recorded at 550nm. All assays were performed in triplicate and metabolic activity of infected and non infected cells was shown to be positively correlated to cell number.

Anoikis- For DNA content, cells were plated in 80mm dishes pre-coated with polyHEMA (Sigma-Aldrich) for 18 h. Cellular DNA content analyses were then performed by flow cytometry as follows. ECs were harvested, washed twice in PBS, fixed in ice-cold 70% ethanol and incubated for at least 24 h at 4°C. Fixed cells were then stained with 50 μ g/ml Propidium Iodide (PI), 100 U/ml RNase A (Sigma-Aldrich), 1 mg/ml glucose in PBS (1 ml/1 x 10⁶ cells). Fluorescence was measured on 10,000 cells/sample using a LSR II® cytometer (BD Biosciences, Franklin Lakes, USA) and analyzed using FlowJo® software (Tree Star, Inc.). Results shown are representative of at least three independent experiments.

Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction RT-PCR- RNA was isolated using TriZol reagent (Invitrogen) and treated with Turbo DNase® (Ambion) before reverse transcription (RT). Transcript levels were quantified by qRT-PCR with the following primers

and probes from Applied Biosystems: Lnk (Hs01081958_g1), α -Parvin (Hs00217177_m1) and HPRT-1 (Hs99999909_m1). Quantitative PCRs were performed using the ABI PRISM 7900 sequence detection application program (PE Applied Biosystems, Foster City, USA) (29). For quantification, triplicates were normalized by the concomitant quantification of hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase(HPRT). Relative expression was calculated according to the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method, as previously described (30).

Statistical Analysis- Results are expressed as means \pm SEM for replicates experiments. Statistical analysis was performed using Graphpad Prism® Software (Graphpad Software, San Diego, CA) by the parametric analysis of variance test as appropriate. A value of $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

Lnk is a key signalling adaptor of the β 1 integrin pathway. In order to identify the role of Lnk in the integrin pathway in ECs, we first analyzed the impact of β 1 integrin (CD29) crosslinking on Lnk protein phosphorylation using an anti- β 1 integrin mAb (clone TS2/16), previously described as an activating β 1 integrin antibody (31). Phosphorylation of Akt at Ser473 and GSK3 β at Ser9 was used as a control to assess CD29-mediated activation of the integrin pathway (Fig. 1A). Next, lysates were used to perform immunoprecipitation assays and indicated that Lnk is phosphorylated at tyrosine residues subsequent to stimulation with anti-CD29 mAb (Fig. 1B). These findings suggest that, in ECs, the adaptor molecule Lnk may be involved in signaling events occurring during integrin pathway activation. To confirm these data, we isolated primary vascular ECs from *Lnk*^{-/-} mice (13). Lack of Lnk expression in EC cultures from KO was confirmed by western blot analysis (Fig. 1C). Next, primary cultures of ECs derived from *Lnk*^{-/-} and wild type mice were treated with an anti- β 1 integrin mAb and cell signaling was investigated on cellular lysates. First, the phosphorylation of Akt and GSK3 β kinases induced by β 1 integrin ligation was examined on murine ECs by western blotting. As expected, wild-type ECs showed a rapid and significant phosphorylation of both Akt and GSK3 β (Fig. 2C). In contrast, anti-CD29 mAb failed to induce phosphorylation of Akt or GSK3 β in *Lnk*^{-/-} ECs, supporting the finding that Lnk plays a major role in the activation of the integrin pathway. Taken together, these results suggest that Lnk is a key regulator of the integrin pathway and is necessary to the activation of β 1 integrin pathway.

Lnk induces Paxillin and FAK phosphorylation. To elucidate mechanisms by which Lnk could regulate the integrin pathway, we sought to define whether Lnk may interact with focal adhesion proteins known to coordinate integrin-mediated signal transduction associated with cell adhesion, migration and proliferation (32) (33) (34) (35). To this aim, we have generated a recombinant adenoviral vector encoding the human Lnk cDNA and the GFP as a reporter gene (AdLnk) to modulate Lnk expression in ECs (25). This vector contains a single promoter, which with the IRES, permits the translation of Lnk and GFP from a single transcript. Controls were nontransduced cells (NI) and cells transduced with a recombinant

adenovirus encoding GFP alone (AdGFP) to account for any effects that may be due to adenoviral infection.

We first sought to determine whether Lnk was able to regulate expression and phosphorylation of focal adhesion proteins. HAECs were transduced with AdLnk (10 to 200 MOI) or AdGFP (50 MOI) for 24 h, and the phosphorylation status of two critical proteins of the integrin pathway, Paxillin on Tyr118 and FAK on Tyr925, was next examined. Paxillin is a multidomain scaffold protein localized to focal adhesions that presents multiple protein-protein interactions to facilitate signaling (36) (37). Tyrosine phosphorylation of Paxillin protein provides additional docking sites for other structural and signaling components (38). FAK is a kinase and a major regulator of focal contact structure, its phosphorylation allows binding of downstream targets (39). Using phosphospecific antibodies for immunoblotting (Fig. 2A and B), we found that Lnk expression was associated with a significant phosphorylation of Paxillin (2.5 ± 0.3 -fold increase as compared to basal level, $*p < 0.05$) and FAK (4.4 ± 0.5 -fold increase as compared to basal level, $*p < 0.05$) in comparison with control or AdGFP, even when Lnk protein level was low (MOI 10). We also observed an important increase in FAK level in Lnk expressing cells. Moreover phosphorylation at tyrosine residues of both proteins and upregulation of FAK promoted by Lnk expression were observed in a dose-dependent manner. These data show that Lnk regulates the expression and phosphorylation of FAK and Paxillin proteins, key mediators of the integrin signaling.

Lnk increases the number of focal adhesions and cell-matrix adhesion. The increased phosphorylation of paxillin and FAK in cells expressing Lnk suggests an enhanced dynamic rearrangement of focal adhesions. Consequently, we hypothesize that Lnk may regulates focal adhesions formation in ECs. Therefore, characterization of cell focal adhesions in HAEC expressing Lnk was performed by double-staining with Phalloidin-TRITC and anti-Vinculin antibody (Fig. 3A). The number of focal adhesions was quantified and revealed a 3.1 fold increase in Lnk expressing cells (Fig. 3B). Furthermore, quantification of the density of vinculin-rich adhesions in spreading cells showed also a 2.8 fold increase (Fig. 3C). These findings indicate that Lnk affects the number of adhesive structures. In fact, Lnk may enhance the formation of focal adhesions but could affect the turnover of focal adhesions as well. We next examined whether these additional focal adhesions were associated with a change in cell morphology and cytoskeleton organization. HAECs were plated on glass coverslips and infected with either control AdGFP or AdLnk for 24 h. ECs expressing Lnk showed significant alterations in cell shape and assumed an elongated morphology clearly visible by

phase contrast microscopy (Fig. 3D). Moreover, F-actin staining revealed an increase in actin fibers in cells transduced with AdLnk compared with noninfected cells or control AdGFP. Cells transduced with AdLnk exhibited a highly organized microfilament network with long actin fibers running through the whole cell body, indicating that Lnk expression induces structural changes in the cytoskeleton organization. We next determined whether the increase in the number and density of focal adhesions could affect directly the adhesion time of ECs on a collagen matrix. ECs infected or not with AdLnk or AdGFP were plated on gelatin-coated 96-well plates and adherent cells were quantified after different time periods (30 min to 60 min). As illustrated in Fig. 3E, the percentage of adherent cells on matrix was significantly increased when cells overexpress Lnk, with a 1.7 fold maximal increase after 40 min. Moreover, spreading cells expressing Lnk attached more tightly to the ECM and showed a delayed detachment during subculturing by trypsin/EDTA than control cells (data not shown). Staining with hematoxylin-eosin after 2 h adhesion also showed an increased in cell spreading in Lnk expressing cells (Fig. 3F). Altogether, these results show a role for Lnk in focal adhesion formation, thus leading to an early increase in cell adhesion and spreading of ECs, as well as changes in the F-actin organization.

Lnk protects ECs from death by anoikis through a PI3K-dependent mechanism. The interaction of cells with the ECM is mediated by the integrin family. Upon detachment from the extracellular matrix, endothelial cells enter into programmed cell death, a phenomenon known as anoikis (40). Our data indicates an enhanced number of focal adhesions and cell adhesion in Lnk expressing cells. Thus, we asked whether Lnk could have an impact on EC survival beyond its regulatory effect on the integrin pathway. ECs were transduced with either control AdGFP or AdLnk and subsequently detached from ECM and maintained in suspension in complete growth medium for 18 h. DNA content analyses were performed by flow cytometry to determine the percentage of apoptotic cells (***sub-G0/G1 population***) (Fig. 4A). As illustrated in Fig. 4B, the percentage of apoptotic cells was significantly decreased in cells overexpressing Lnk compared to control cells ($52.1 \pm 7.0\%$ and $50.1 \pm 4.5\%$ for NI and AdGFP, respectively, *versus* $28.3 \pm 2.0\%$ for AdLnk of apoptotic cells, *****p<0.01***). We previously reported that Lnk activates the PI3K pathway in ECs leading to the phosphorylation of the Akt kinase (Fig. 4C) (25). Akt is a well described kinase that phosphorylates a broad array of downstream molecular targets including targets controlling cell survival and apoptosis (41). Moreover, it has been shown that PI3K and the protein kinase Akt mediate protection from anoikis (42). To determine whether the suppression of apoptosis

in Lnk expressing cells results from activation of the PI3K pathway, ECs were transduced with AdLnk in the presence or absence of two selective inhibitors of the PI3K, LY294002 and Wortmannin, and then subjected to anoikis. As illustrated in Fig. 4D, we found that in contrast to controls, the presence of both inhibitors significantly increases the number of apoptotic Lnk expressing cells ($38.1 \pm 4.2\%$ for AdLnk *versus* $53.8 \pm 2.8\%$ and $59.1 \pm 3.7\%$ for AdLnk in the presence of LY294002 and Wortmannin, respectively, $*p < 0.05$, $**p < 0.01$). Consequently, inhibition of the PI3K abrogates the protection displayed by Lnk in ECs since no significant difference was found compared to controls (EC either non infected or infected with AdGFP). Together, our data demonstrate that Lnk protects ECs from apoptosis occurring as a result of ECM detachment in a PI3K-dependent manner.

Lnk decreases EC migration through a regulatory effect on α -parvin protein. Cell migration is a multistep process, requiring the dynamic reorganization of the actin cytoskeleton and focal adhesions turnover. The significant increase of adhesive structures and modification in cell morphology and cytoskeleton architecture prompted us to examine the migration in ECs expressing Lnk. To evaluate the role of Lnk in cell motility, we wounded confluent monolayers of ECs transduced with AdLnk or control AdGFP and then measured the migration of the cells into the cell-free area. Our results showed that Lnk significantly reduced EC migration by ~30% as compared to controls ($79.5 \pm 1.4\%$ for NI and $64.1 \pm 2.3\%$ for AdGFP *versus* $48.4 \pm 1.9\%$ for AdLnk of wound closed, $**p < 0.01$) (Fig. 5B). Representative phase contrast micrographs illustrating repair of endothelial injuries are shown in Fig. 5A. Thus, Lnk significantly reduces cell migration.

We have demonstrated that Lnk increases the number of focal adhesions that results in a gain in cell attachment. The modification of cell-matrix adhesion dynamics in ECs could explain change the in cell motility but other unidentified pathways and proteins may be involved in this phenomenon. To further investigate the reduced migration phenotype in Lnk expressing cells, we tested whether Lnk could affect other focal adhesion proteins involved in the migration process by western blotting. We found that increase in the level of the Lnk protein did not affect ILK or PINCH-1 expression whereas the α -parvin protein level was dramatically decreased in a dose-dependent manner (Fig. 6A). To investigate whether α -parvin extinction could decrease ECs migration we used a loss-of-function model for α -parvin using α -parvin siRNAs. ECs were transfected with specific α -parvin targeted siRNAs. Non targeting scrambled siRNAs were used as controls. Among the tested siRNAs, two displayed a significant down-regulation of α -parvin, at protein level (siRNA PARVA1 and PARVA2)

(Fig. 6B). Figure 6C demonstrates that, in contrast to siRNA control, α -parvin silencing significantly decreases EC migration in a wound healing assay ($73.4 \pm 1.6\%$ for siRNA Control *versus* $62.9 \pm 2.5\%$ for siRNA PARVA1 of wound closed, $**p < 0.01$). To further investigate whether reduced levels of the actin binding protein α -parvin might be partially responsible for the delayed migration observed in Lnk expressing cells, plasmids encoding for α -parvin phospho-mutant (Quint) or α -parvin wild-type cDNA were used. Plasmid encoding for α -parvin mutant (Quint) induces expression of a quintuple nonphosphorylatable mutant of α -parvin (28). Phosphorylation of α -parvin is essential for its activity, thus Quint plasmid was used as a control in our experiments. Transfection efficiency (Quint or wild-type α -parvin) was controlled by Western Blotting using Xpress antibody (Fig. 6D). HUVECs were then transfected with Quint mutant or α -parvin cDNA before Lnk expression and confluent monolayers were wounded. As illustrated in Fig. 6E, transfection of Quint and α -parvin plasmids does not affect migration of controls cells (AdGFP). Moreover, Lnk expression results in a reduced HUVEC migration as observed in HAEC. In contrast, α -parvin expression partially restores motility of Lnk cells compared to Quint expressing cells ($58.3 \pm 6.3\%$ of AdLnk transfected α -parvin plasmid *versus* $34.3 \pm 4.5\%$ for AdLnk transfected Quint plasmid of wound closed, $*p < 0.05$). Thus, recombinant α -parvin expression rescued, although not completely, the reduced migration capacity of Lnk cells. These results indicate that the impaired migratory phenotype of Lnk cells is, at least in part, due to a reduced expression of α -parvin protein.

To better characterize the regulation of endogenous Lnk and α -parvin molecules during EC migration, confluent monolayers of ECs were wounded and transcript levels were analyzed by RT-PCR during the time-course of migration (from 2 to 6 h). As shown in Fig. 7, the mRNA levels of Lnk and α -parvin are selectively modulated during the migration process. In fact, Lnk mRNA level rapidly decreases with a significant effect starting 2 h after the induction of migration and with a maximal inhibition after 5 h of $94.6 \pm 1.0\%$ as compared with the basal mRNA level ($*p < 0.05$). In contrast, an enhanced mRNA level for α -parvin was found during migration, corresponding to a 2.9 ± 0.7 -fold increase after 2 h as compared with the basal mRNA level ($*p < 0.05$). Upon EC migration, Lnk and α -parvin mRNAs are concomitantly, strongly and differentially regulated toward an increase for α -parvin and an inhibition for Lnk mRNA levels. Together, these findings support the role for Lnk as a negative regulator of the EC migration and confirm the importance of α -parvin in the course of migration.

Lnk forms complex with ILK and inhibits ILK- α -parvin interaction. To further identify molecular binding partners for Lnk among focal adhesion proteins, lysates of ECs infected with control AdGFP or AdLnk were immunoprecipitated with anti-Lnk Abs and then analyzed by Western blotting using anti-ILK Abs. Lysates immunoprecipitated with irrelevant Abs were used as controls. As illustrated in Fig. 8A IP, Lnk co-precipitates efficiently with ILK, thus indicating ILK-Lnk complex formation. Moreover, immunoprecipitated proteins from cells infected with AdLnk showed an increase in the amount of ILK protein associated with Lnk, despite similar ILK expression in all samples. These results indicate that increased expression of Lnk in ECs promotes ILK-Lnk complex formation. As a control, lysates have been analyzed by Western blotting before immunoprecipitation (Fig. 8A, Lysates), and indicate a similar expression of ILK in samples. ILK and adaptors of parvin families form a complex that localizes to integrin adhesions. To test whether Lnk could decrease α -parvin protein levels by inhibiting the formation of the ILK- α -parvin interaction we performed immunoprecipitation using anti- α -parvin antibody. To avoid α -parvin depletion induced by Lnk expression, infections were achieved using low amount of viral particles (MOI 5). As control, Western blot analysis of lysates and immunoprecipitates derived from the Lnk overexpressing or control cells were performed and confirmed a similar expression of α -parvin in samples (Fig. 8B, Lysates and IP). Blots were next reprobed with anti-ILK Abs. As illustrated in Fig. 8C, IP derived from the Lnk overexpressing cells showed a slight but consistent decrease of the ILK- α -parvin association, indicating that increased expression of Lnk could inhibit ILK- α -parvin interaction. Thus, expression of Lnk promotes the formation of ILK-Lnk complex and concomitantly inhibits the formation of ILK- α -parvin complex. Taken together these data suggest that sustained expression of Lnk favors a binding of ILK to Lnk that could negatively modulate ILK- α -parvin association.

Discussion

Vascular remodeling that occurs whenever a vessel is injured could ultimately lead to TA (1). Cell migration, apoptosis and proliferation are major processes controlling vascular remodeling. In this study, we have demonstrated that Lnk is an adaptor protein involved in the integrin pathway, and an effective regulator of adhesion and migration of ECs *in vitro*.

Here, we have showed that ligation of vascular integrin by crosslinking β 1 integrin on EC surface induces the phosphorylation of the adaptor protein Lnk. Its regulation is concomitant

to the phosphorylation of both Akt (protein kinase B) and GSK3 β kinases observed at 30 minutes. Phosphorylation of Akt and GSK3 β features integrin-mediated signaling and is the most widely used readouts for ILK activity (43) (44). A confirmatory step was achieved by the ligation of integrin on *Lnk*^{-/-} endothelial cells. In this model, we demonstrated that the absence of Lnk totally abrogates the activation of Akt and GSK3 β in response to β 1 integrin ligation suggesting that activation of ILK and integrin signaling requires Lnk function. Together, these findings indicate that Lnk is a novel and effective adaptor of integrin signaling in vascular ECs. Accordingly, a recent study demonstrated that Lnk regulates integrin signaling in platelets and stabilizes developing thrombi *in vivo* (45). Takizawa *et al.* showed that Lnk is required for platelets to fully spread on fibrinogen and promotes integrin α IIb β 3-mediated actin cytoskeletal reorganization. Thus the involvement of Lnk in integrin signaling seems to be not limited to ECs and could be a ubiquitous function of this adaptor protein, although its implication in different cell types remains to be demonstrated.

Lnk appears to be at the crossroads of cell adhesion, cytokine and growth factor modulation of intracellular signal transduction pathways (14) (46) (13) (16). A common point between these diverse extracellular stimuli is that they provoke significant changes in the organization of the cytoskeleton and/or in cellular proliferation. Our study reports that Lnk induces modifications in actin fibers organization and cell morphology as well as increases the number of focal adhesions. Most notably, Lnk expressing cells assume an elongated morphology, which is similar to transfected cells expressing ILK constitutively (47). Moreover, Boulter *et al.* showed that expression of membrane-targeted ILK in fibroblasts induced a marked increase in the number of adhesions per cell (48). ILK is a well described serine/threonine kinase, first identified using a yeast two-hybrid screen, which directly associates with the cytoplasmic tail of β 1 and β 3 subunits (49). A more recent study has shown that ILK complements defective integrin activation in mutant cell lines expressing inactivated integrin α IIb α 6 β 3, thus ILK is associated with integrin activation and could contribute to inside-out integrin activation (50). We have demonstrated that Lnk affects the number of FAs, suggesting that Lnk could promote activation of integrin pathway through its association with ILK.

Another major finding of this study is that Lnk downregulates the protein level of α -parvin in cells. A previous report indicated that siRNA-mediated silencing of ILK expression resulted in not only depletion of ILK but also a substantial reduction in PINCH-1 protein level and a modest reduction in α -parvin protein level suggesting that PINCH-1, ILK, and to less extent α -parvin depend on each other for maintenance of their protein levels in cells (51) (52). In this

study, as Lnk causes no change in ILK and PINCH1 expression, we conclude that depletion of α -parvin by Lnk is independent from ILK level. Functionally, our results also agree with previous observations showing that silencing of α -parvin impairs cell migration (28). Therefore, we speculated that Lnk may act on cell migration through a downregulation of α -parvin. Our experiments using wild type and mutated forms of α -parvin clearly demonstrate that transfection of WT- α -parvin but not Quint- α -parvin significantly restores cell motility in Lnk cells. Quint- α -parvin expression does not allow complete recovery of cell migration, which suggests that phosphorylation of α -parvin is necessary. Thus, Lnk provides a mechanism for the regulation of cell migration *via* modulation of α -parvin expression. In fact, transcript analysis during migration revealed a significant decrease in Lnk mRNA concomitant to an enhanced α -parvin mRNA level. This observation supports a role for Lnk as a negative regulator of cell migration and confirms the importance of α -parvin in this process. Furthermore, immunoprecipitation experiments indicate that Lnk could negatively regulate the cellular level of α -parvin through its interaction with ILK protein. We propose a model in which up-regulation of Lnk enhances ILK-Lnk complex formation at the expense of ILK- α -parvin association, blocking α -parvin access to FAs.

Increase of FAK phosphorylation is concomitant with elevated FAK expression in Lnk expressing cells, thus Lnk upregulates and induces FAK phosphorylation. However, the accumulation of P-FAK observed in a dose-dependent way could be due to the increase of the non-phosphorylated FAK pool. The increased number of focal adhesion contacts observed in Lnk expressing cells is consistent with the hyperphosphorylation of FAK and paxillin proteins. Nevertheless, the increased phosphorylation pattern of FAK and paxillin suggests a promigratory signal while cell migration in Lnk cells is decreased. Our findings revealed the role of α -parvin inhibition in decreased cell motility but recombinant α -parvin expression rescued only partially the reduced migration capacity of Lnk cells. These results suggest that additive mechanisms may be involved in the delayed migration. Phosphorylation of FAK at various tyrosine residues regulates focal adhesion turnover by mechanisms that are not well understood. In fact, it has been shown that fibroblasts from *FAK*^{-/-} mice contain an abundance of FAs with a maturation defects and reduced migration (53). Moreover, studies of cells lacking the tyrosine phosphatase SHP2 (SH2-domain-containing protein tyrosine phosphatase 2), a regulator of FAK phosphorylation, support the role of FAK in FA disassembly. *SHP2*^{-/-} cells have increased FAK activity, but they also showed an accumulation of immature FAs and similar migration defects to *FAK*^{-/-} cells (54). These reports suggest the importance of the balance of FAK phosphorylation in the control of FAs dynamics and maturation. According

to these findings, we cannot exclude the possibility that Lnk could also impair migration by altering FA turnover and maturation.

In the absence of any extracellular matrix interactions, ECs rapidly undergo apoptosis, a phenomenon called anoikis. The second fundamental process in which Lnk is critically involved is cell survival. This is clearly demonstrated by the findings that sustained expression of Lnk significantly protects EC from apoptosis. The present study suggests that Lnk protects EC, at least in part, by promoting the phosphorylation of Akt, a signaling intermediate that is of central importance in cell survival signaling. Many downstream proteins have been identified as targets of ILK kinase activity, including Akt. Several studies indicate that the kinase activity of ILK is directly responsible for the phosphorylation of Ser 473 and thereby full activation of Akt (43) (55) (56) (57) (58). However, the mechanism by which ILK promotes Akt phosphorylation is still controversial, as other studies suggest that ILK may function as an adaptor protein rather than a kinase in regulating Akt activity (59). Presently, we can only speculate about the action of Lnk on the Akt phosphorylation. Demonstrated regulation of Akt activity by ILK and the interaction between Lnk and ILK, are in agreement with a phosphorylation of Akt induced by Lnk *via* ILK activity. However, the role of Lnk in cell survival could involve other functions besides the regulation of Akt phosphorylation.

Previous report provided evidence for an interaction between Lnk and actin, notably through a direct interaction with the actin binding protein ABP-280 (filamin A) that facilitates actin assembly (60). Events of phosphorylation and dephosphorylation of ABP-280 have been postulated to play a dynamic role in the organization of the cytoskeleton (61). Nevertheless, whether Lnk may facilitate ABP-280 phosphorylation remains to be defined. Another member of the Lnk family, APS (adaptor protein with PH and SH2 domains or SH2B2) was shown to colocalize with F-actin in B cells (62) and was found to be a molecular partner for Enigma. Enigma and APS are colocalized with F-actin in insulin-induced membrane ruffles (63). Thus, our findings further support the fact that regulation of the actin cytoskeleton is a common function of this adaptor family (APS, SH2B and Lnk). *Lnk*^{-/-} endothelial cells were used in migration and adhesion assays and surprisingly do not present significant differences compared to wild type cells (data not shown). Therefore, the lack of Lnk in ECs could be compensated for other family members such as APS. However, the role that APS and SH2B1 may play in vascular cell shape remains to be explored.

In conclusion, we have provided evidence for a new regulatory mechanism by which the Lnk adaptor controls EC cytoskeleton organization, migration and survival. Lnk takes part in

integrin signaling through its direct interaction with ILK, and is required for efficient phosphorylation of Akt and GSK3 β during integrin activation. Lnk up-regulation is associated with a functional decrease in α -parvin expression. This correlates with a delayed migration that may correspond to the end of a promigratory signal and a return to cell quiescence. We have previously established Lnk as a negative regulator of TNF signaling, indicating a potential role in controlling inflammation. Overall, our findings suggest that Lnk is a pivotal adaptor in vascular ECs that regulates at least two major signaling pathways (TNF and β -integrin) in the endothelium. We anticipate a role for Lnk in negative feedback regulatory loops that control the dynamics of signal transduction.

Finally, the regulatory functions of Lnk in multiple interconnected intracellular signaling pathways highlights its therapeutic potential as a molecular target for the prevention of vascular diseases.

References

1. Mitchell, R. and Libby, P. (2007) *Circ Res* **100**, 967-78
2. Libby, P. and Pober, J. (2001) *Immunity* **14**, 387-97
3. Pober, J., Orosz, C., Rose, M., and Savage, C. (1996) *Transplantation* **61**, 343-9
4. Pober, J., Min, W., and Bradley, J. (2009) *Annu Rev Pathol* **4**, 71-95
5. Lauffenburger, D. and Horwitz, A. (1996) *Cell* **84**, 359-69
6. Sheetz, M., Felsenfeld, D., Galbraith, C., and Choquet, D. (1999) *Biochem Soc Symp* **65**, 233-43
7. Avraamides, C., Garmy-Susini, B., and Varner, J. (2008) *Nat Rev Cancer* **8**, 604-17
8. Huang, X., Li, Y., Tanaka, K., Moore, K., and Hayashi, J. (1995) *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 11618-22
9. Takaki, S., Watts, J., Forbush, K., Nguyen, N., Hayashi, J., Alberola-Ila, J., Aebersold, R., and Perlmutter, R. (1997) *J Biol Chem* **272**, 14562-70
10. Yokouchi, M., Suzuki, R., Masuhara, M., Komiya, S., Inoue, A., and Yoshimura, A. (1997) *Oncogene* **15**, 7-15
11. Takizawa, H., Eto, K., Yoshikawa, A., Nakauchi, H., Takatsu, K., and Takaki, S. (2008) *Exp. Hematol* **36**, 897-906
12. Simon, C., Dondi, E., Chaix, A., de Sepulveda, P., Kubiseski, T., Varin-Blank, N., and Velazquez, L. (2008) *Blood* **112**, 4039-47
13. Velazquez, L., Cheng, A., Fleming, H., Furlonger, C., Vesely, S., Bernstein, A., Paige, C., and Pawson, T. (2002) *J Exp Med* **195**, 1599-611
14. Takaki, S., Sauer, K., Iritani, B., Chien, S., Ebihara, Y., Tsuji, K., Takatsu, K., and Perlmutter, R. (2000) *Immunity* **13**, 599-609
15. Takaki, S., Tezuka, Y., Sauer, K., Kubo, C., Kwon, S., Armstead, E., Nakao, K., Katsuki,

- M., Perlmutter, R., and Takatsu, K. (2003) *J Immunol* **170**, 703-10
16. Seita, J., Ema, H., Ooehara, J., Yamazaki, S., Tadokoro, Y., Yamasaki, A., Eto, K., Takaki, S., Takatsu, K., and Nakauchi, H. (2007) *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 2349-54
 17. Bersenev, A., Wu, C., Balcerek, J., and Tong, W. (2008) *J Clin Invest* **118**, 2832-44
 18. Kwon, S., Suzuki, T., Kawamoto, A., Ii, M., Eguchi, M., Akimaru, H., Wada, M., Matsumoto, T., Masuda, H., Nakagawa, Y., Nishimura, H., Kawai, K., Takaki, S., and Asahara, T. (2009) *Circ Res* **104**, 969-77
 19. Kamei, N., Kwon, S., Alev, C., Ishikawa, M., Yokoyama, A., Nakanishi, K., Yamada, K., Horii, M., Nishimura, H., Takaki, S., Kawamoto, A., Ii, M., Akimaru, H., Tanaka, N., Nishikawa, S., Ochi, M., and Asahara, T. (2010) *Stem Cells* **28**, 365-75
 20. Kubo-Akashi, C., Iseki, M., Kwon, S., Takizawa, H., Takatsu, K., and Takaki, S. (2004) *Biochem Biophys Res Commun* **315**, 356-62
 21. Tong, W. and Lodish, H. (2004) *J Exp Med* **200**, 569-80
 22. Tong, W., Zhang, J., and Lodish, H. (2005) *Blood* **105**, 4604-12
 23. Takizawa, H., Kubo-Akashi, C., Nobuhisa, I., Kwon, S., Iseki, M., Taga, T., Takatsu, K., and Takaki, S. (2006) *Blood* **107**, 2968-75
 24. Boulday, G., Coulon, F., Fraser, C., Soulillou, J., and Charreau, B. (2002) *Transplantation* **74**, 1352-4
 25. Fitau, J., Boulday, G., Coulon, F., Quillard, T., and Charreau, B. (2006) *J Biol Chem* **281**, 20148-59
 26. Coupel, S., Leboeuf, F., Boulday, G., Soulillou, J., and Charreau, B. (2004) *J Am Soc Nephrol* **15**, 2429-39
 27. Nikolopoulos, S. and Turner, C. (2000) *J Cell Biol* **151**, 1435-48
 28. Clarke, D., Brown, M., LaLonde, D., and Turner, C. (2004) *J Cell Biol* **166**, 901-12
 29. Quillard, T., Devalliere, J., Chatelais, M., Coulon, F., Séveno, C., Romagnoli, M., Barillé

- Nion, S., and Charreau, B. (2009) *PLoS ONE* **4**, e8244
30. Livak, K. and Schmittgen, T. (2001) *Methods* **25**, 402-8
31. Arroyo, A., Sanchez-Mateos, P., Campanero, M., Martin-Padura, I., Dejana, E., and Sanchez-Madrid, F. (1992) *J Cell Biol* **117**, 659-70
32. Clark, E. and Brugge, J. (1995) *Science* **268**, 233-9
33. Giancotti, F. and Ruoslahti, E. (1999) *Science* **285**, 1028-32
34. Geiger, B., Bershadsky, A., Pankov, R., and Yamada, K. (2001) *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 793-805
35. Hynes, R. (2002) *Cell* **110**, 673-87
36. Turner, C. (1998) *Int J Biochem Cell Biol* **30**, 955-9
37. Turner, C. (2000) *Nat Cell Biol* **2**, E231-6
38. Brown, M. and Turner, C. (2004) *Physiol Rev* **84**, 1315-39
39. Mitra, S., Hanson, D., and Schlaepfer, D. (2005) *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 56-68
40. Gilmore, A. (2005) *Cell Death Differ* **12 Suppl 2**, 1473-7
41. Shiojima, I. and Walsh, K. (2002) *Circ Res* **90**, 1243-50
42. Khwaja, A., Rodriguez-Viciana, P., Wennstrom, S., Warne, P., and Downward, J. (1997) *Embo J* **16**, 2783-93
43. Delcommenne, M., Tan, C., Gray, V., Rue, L., Woodgett, J., and Dedhar, S. (1998) *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 11211-6
44. Defilles, C., Lissitzky, J., Montero, M., Andre, F., Prevot, C., Delamarre, E., Marrakchi, N., Luis, J., and Rigot, V. (2009) *Exp Cell Res* **315**, 1840-9
45. Takizawa, H., Nishimura, S., Takayama, N., Oda, A., Nishikii, H., Morita, Y., Kakinuma, S., Yamazaki, S., Okamura, S., Tamura, N., Goto, S., Sawaguchi, A., Manabe, I., Takatsu, K., Nakauchi, H., Takaki, S., and Eto, K. (2010) *J Clin Invest* **120**, 179-90

46. Takaki, S., Morita, H., Tezuka, Y., and Takatsu, K. (2002) *J Exp Med* **195**, 151-60
47. Khyrul, W., LaLonde, D., Brown, M., Levinson, H., and Turner, C. (2004) *J Biol Chem* **279**, 54131-9
48. Boulter, E., Grall, D., Cagnol, S., and Van Obberghen-Schilling, E. (2006) *Faseb J* **20**, 1489-91
49. Hannigan, G., Leung-Hagesteijn, C., Fitz-Gibbon, L., Coppolino, M., Radeva, G., Filmus, J., Bell, J., and Dedhar, S. (1996) *Nature* **379**, 91-6
50. Honda, S., Shirotani-Ikejima, H., Tadokoro, S., Maeda, Y., Kinoshita, T., Tomiyama, Y., and Miyata, T. (2009) *Blood* **113**, 5304-13
51. Fukuda, T., Chen, K., Shi, X., and Wu, C. (2003) *J Biol Chem* **278**, 51324-33
52. Stanchi, F., Grashoff, C., Nguemini Yonga, C. F., Grall, D., Fässler, R., and Van Obberghen-Schilling, E. (2009) *J. Cell. Sci* **122**, 1800-1811
53. Ilic, D., Furuta, Y., Kanazawa, S., Takeda, N., Sobue, K., Nakatsuji, N., Nomura, S., Fujimoto, J., Okada, M., and Yamamoto, T. (1995) *Nature* **377**, 539-44
54. von Wichert, G., Haimovich, B., Feng, G., and Sheetz, M. (2003) *Embo J* **22**, 5023-35
55. Persad, S., Attwell, S., Gray, V., Delcommenne, M., Troussard, A., Sanghera, J., and Dedhar, S. (2000) *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 3207-12
56. Zhang, Y., Chen, K., Guo, L., and Wu, C. (2002) *J Biol Chem* **277**, 38328-38
57. Zhang, Y., Chen, K., Tu, Y., Velyvis, A., Yang, Y., Qin, J., and Wu, C. (2002) *J Cell Sci* **115**, 4777-86
58. Attwell, S., Mills, J., Troussard, A., Wu, C., and Dedhar, S. (2003) *Mol Biol Cell* **14**, 4813-25
59. Legate, K., Montanez, E., Kudlacek, O., and Fassler, R. (2006) *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 20-31
60. He, X., Li, Y., Schembri-King, J., Jakes, S., and Hayashi, J. (2000) *Mol Immunol* **37**, 603-12

61. Kovacsovics, T. and Hartwig, J. (1996) *Blood* **87**, 618-29
62. Iseki, M., Kubo, C., Kwon, S., Yamaguchi, A., Kataoka, Y., Yoshida, N., Takatsu, K., and Takaki, S. (2004) *Mol Cell Biol* **24**, 2243-50
63. Barres, R., Gonzalez, T., Le Marchand-Brustel, Y., and Tanti, J. (2005) *Exp Cell Res* **308**, 334-44

Footnotes

The authors thank Philippe Hulin and the “confocal microscopy and cellular imaging platform” of IFR26 for time lapse study. We thank the vector core of the University Hospital of Nantes supported by the Association Française contre les Myopathies (AFM) for providing the adenoviral vectors. 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 La Fondation Progreffe and la Fondation Centaure. Devallière J. was supported by a grant from « la Région Pays de la Loire ».

The abbreviations used are : DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole; DMSO: dimethyl sulfoxide; ECs: endothelial cells; ECM: extracellular matrix; EDTA: ethylen diamine tetracetic acid ; EGF: endothelial growth factor; FA : focal adhesion ; FAK: focal adhesion kinase; FGF: fibroblast growth factor ; GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; GSK3 β : glycogen synthase kinase 3 β ; HAEC: human arterial EC; HUVEC: human umbilical vein EC; ILK: integrin-linked kinase; IP: immunoprecipitation; PI: propidium iodide; PI3K: phosphatidylinositol 3-kinase; Quint: quintuple; MTT: 3-[4,5 dimethylthiazol-2-yl] 2,5diphenyltetrazolium; TA : transplant arteriosclerosis ; TNF- α : tumor necrosis factor alpha; SDS: sodium dodecyl sulfate ; SH2-B : Src homology 2-B

Figures Legends

Fig. 1. Activation of the integrin pathway in ECs induces phosphorylation of Lnk and requires Lnk expression. Human confluent EC monolayers were incubated with anti-CD29 (β 1-integrin) or an irrelevant (control) antibody for the indicated periods. A, Activation of the integrin pathway was assessed by immunoblotting with phosphospecific (P-Akt) and total Akt, phosphospecific (P- GSK3 β) and total GSK3 β . Immunoblots shown are representative of three independent experiments. Blots were reprobated with an anti-GAPDH antibody to ensure equal loading. B, A representative analysis showing Lnk tyrosine phosphorylation and expression after incubation with anti-CD29 (30 and 45 min) or an irrelevant (control) antibody. Immunoprecipitations were performed using anti-Lnk antibodies and the subsequent immunoblotting was achieved using anti-phosphotyrosine monoclonal antibody (*upper panel*) and anti-Lnk antibodies (*lower panel*). A, Mouse ECs were isolated from wild-type (WT) or Lnk knock-out (*Lnk*^{-/-}) mice. A representative Western blot analysis comparing Lnk expression in WT and *Lnk*^{-/-} ECs. Equal loading was confirmed using an anti-tubulin antibody. C, Confluent mouse EC monolayers were incubated with anti-CD29 (β 1-integrin) or an irrelevant (control) antibody for the indicated periods. Integrin pathway activation was determined by immunoblotting with phosphospecific (P-Akt) and total Akt, phosphospecific (P- GSK3 β) and total GSK3 β . Blots were reprobated using an anti-GAPDH antibody to ensure equal loading. Data shown are representative of 3 independent experiments.

Fig. 2. Lnk elicits the phosphorylation of the focal adhesion proteins FAK and Paxillin in ECs. ECs were either noninfected (NI) or infected with control AdGFP (MOI 50) or AdLnk (at MOI ranging from 10 to 200). Cells were lysed 24h after transduction and cytosolic proteins were harvested as described in “Materials and methods”. A, FAK and P-FAK expression was determined by Western blot and compared to Lnk level. P-FAK expression was quantified after normalization to GAPDH and results are expressed as a percentage of basal expression, *p<0.05. B, Paxillin and P-Paxillin expression was determined by Western blot and compared to Lnk level. P-Paxillin expression was quantified after normalization to GAPDH and results are expressed as a percentage of basal expression, *p<0.05. Representative results of three independent experiments are shown.

Fig. 3. Lnk increases the number of cell focal adhesions promotes EC adhesion and triggers actin cytoskeleton reorganization. ECs were plated on glass coverslips and infected with either control AdGFP or AdLnk for 24 h. A, For immunofluorescence, ECs were fixed with 1% paraformaldehyde and stained for F-actin (Phalloidin-TRITC, *red*), to determine

mean surface area, Vinculin (for focal adhesions, *green*) and nuclei (DAPI, *blue*). *Bar*, 10 μ m. B, The number of focal adhesions per cell was quantified using MetaMorph® software (mean \pm SEM, n=20, ***p<0.0001 *versus* control). C, Density of focal adhesions was obtained by dividing number of focal adhesions by the cell surface area (mean \pm SEM, n=20, ***p<0.0001 *versus* control). D, Cell morphology examined by phase microscopy (upper panel); *Bar*, 100 μ m. For fluorescence, ECs were fixed with 1% paraformaldehyde and stained for F-actin (phalloidin-TRITC, *red*) and nuclei (Dapi, *blue*). *Bar*, 10 μ m. E, for the quantification of cell adhesion, HAECs were infected with either control (AdGFP) or AdLnk for 24h, and then plated on gelatin coated plates for different periods of time. Adherent cells were quantified by MTT staining and results are express as a percentage (mean \pm SEM, n=8, *p<0.05 *versus* control, **p<0.01 *versus* control). F, A representative picture showing adhesion at 2 h of ECs transduced with AdLnk or AdGFP as a control. Cells were fixed and stained with hematoxylin-eosin. *Bar*, 40 μ m.

Fig. 4. Lnk prevents EC death induced by Anoikis by a PI3K-dependent mechanism.

HAECs were noninfected (NI) or transduced with either control AdGFP or AdLnk. A, After infection, cells were plated in 80mm dishes pre-coated with polyHEMA for 18 h. DNA content analyses were performed by flow cytometry using PI staining and percentages of apoptotic cells corresponding to sub-G0/G1 population are indicated. B, Histograms of 6 independent experiments quantifying the percentage of apoptotic cells (% sub G0/G1 population) measured by flow cytometry using PI staining (mean \pm SEM, n=6, **p<0.01 *versus* control). C, A representative Western blot analysis for Lnk, Akt and P-Akt expression. Equal loading was confirmed using an anti-tubulin antibody. D, After infection, cells were plated in 80mm dishes pre-coated with polyHEMA for 18 h with or without LY294002 and Wortmannin. DNA content analyses were performed by flow cytometry using PI staining and percentages of apoptotic cells corresponding to sub-G0/G1 population were quantified (mean \pm SEM, n=4, *p<0.05, **p<0.01 *versus* control; ns, not significant).

Fig. 5. Lnk decreases EC migration in wound repair assay.

ECs were noninfected (NI) or transduced with either control adenoviruses (AdNull, AdGFP) or AdLnk and subjected to a scratch assay. Wound closure was followed for 18 h by time lapse imaging. A, Representative pictures of healing for noninfected (NI) *versus* AdLnk transduced EC monolayers at 0 and 6 h after wounding. B, The percentage of wound closed 6h after wounding was measured and

express as a percent of wound closed compared to control (t=0 h, mean \pm SEM, n=4, **p<0.01 *versus* control).

Fig. 6. Lnk expression decreases migration of ECs in wound repair assay through inhibition of α -parvin expression. A, HAECs were noninfected (NI) or infected with either control AdGFP (MOI 50) or AdLnk (MOI 10-200). Western blot analyses for Lnk, α -parvin, ILK and PINCH-1 were performed and representative results of three independent experiments are shown (*upper panel*). Alpha-parvin expression (*lower panel*) was quantified after normalization to GAPDH and express as a percent of basal expression, *p<0.05). B, HAECs were transfected with the control siRNA (CTL) or the α -parvin-specific siRNAs (ParvA1, ParvA2) and silencing of α -parvin was determined by Western blot using anti- α -parvin antibodies. Blots were reprobbed with an anti-GAPDH antibody to ensure equal loading. C, Ad-transduced and silenced ECs were subjected to scratch assay. Wound closure was followed for 18 h by time lapse videomicroscopy and percentage of wound closed was measured using MetaMorph™ Imaging software. Results are express as a percentage of wound closed compared to control t=0 h, mean \pm SEM, n=3, **p<0,01 *versus* control. D, HUVECs were either nontransfected (NT) or transfected with plasmids encoding wild type (α -parvin) or non phosphorylable (Quint mutant) α -parvin cDNA and immunoblotted using anti-Xpress tag. E, HUVECs were transfected with plasmids encoding wild type (α -parvin) or non phosphorylable (Quint mutant) α -parvin cDNA and were subsequently infected with either control AdGFP or AdLnk. Cells were subjected to scratch assay and wound closure was followed for 36 h by time lapse videomicroscopy. Percentage of wound closed 33h after wounding measured using MetaMorph™ Imaging software Results are express as a percentage of wound closed compared to control (t=0 h), mean \pm SEM, n=3,*p<0.05 *versus* control, ns: non significant.

Fig. 7. Regulation of Lnk and α -parvin mRNA levels during migration in wound repair assay. ECs were subjected to a scratch assay and cells were harvested at different periods of time (0, 2h, 3h, 4h, 5h, 6h). A, qRT-PCR for Lnk representative of three independent experiments, Lnk mRNA level was normalized to HPRT-1 (% of basal level, mean \pm SEM, **p<0.01 *versus* control). B, qRT-PCR for α -parvin representative of three independent experiments, α -parvin mRNA level was normalized to HPRT-1 (% of basal level, mean \pm SEM, **p<0.01 *versus* control).

Fig. 8. Lnk forms complex to ILK and inhibits ILK- α -parvin interaction. HAECs were noninfected (Control) or infected with either control AdGFP or AdLnk at MOI 5 or 30. A, Cell lysates (MOI 30) were analyzed by Western blot with an anti-ILK antibody (*left panel, Lysates*) as a loading control. Control lane represents noninfected cells. The cell lysates were then immunoprecipitated with an anti-Lnk antibody and IP were analyzed by Western blot with anti-ILK antibody (*right panel, IP*). Control lane represents lysate immunoprecipitated with an irrelevant antibody. B, Cell lysates (MOI 5 to avoid total inhibition of α -parvin) were analyzed by Western blotting using anti- α -parvin antibody (*left panel*). IP were performed as above using anti- α -parvin antibody and subjected to Western blotting with anti- α -parvin antibodies (*right panel*). C, Lysates of ECs (MOI 5) were analyzed by Western blotting with anti-ILK antibody (*left panel*). IP were performed as above using anti- α -parvin antibody and subjected to Western both for ILK (*right panel*). D, Relative expression of ILK was quantified by densitometry in IP anti-Lnk (% of AdGFP control, mean \pm SEM, n=3, *p<0.05 *versus* control). E, Relative expression of ILK was quantified by densitometry in IP anti- α -parvin (% of AdGFP control, mean \pm SEM, n=3, *p<0.05 *versus* control).

Figure 1

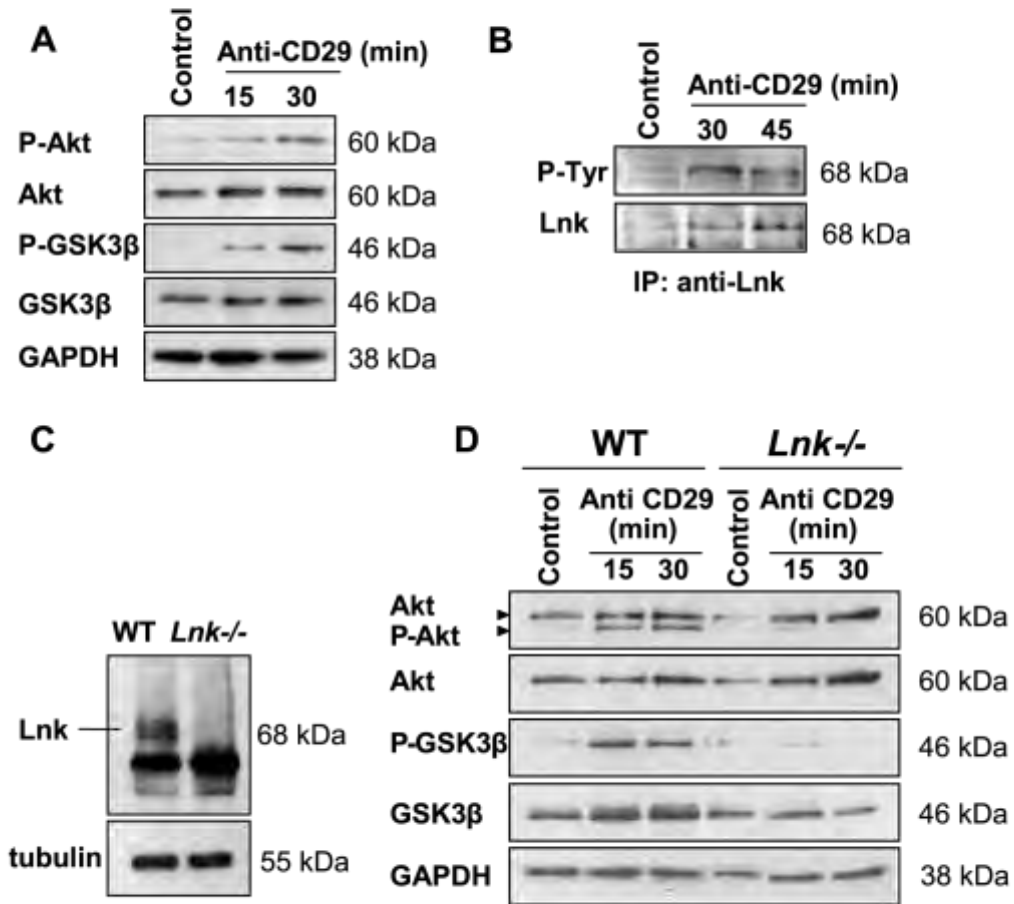


Figure 2

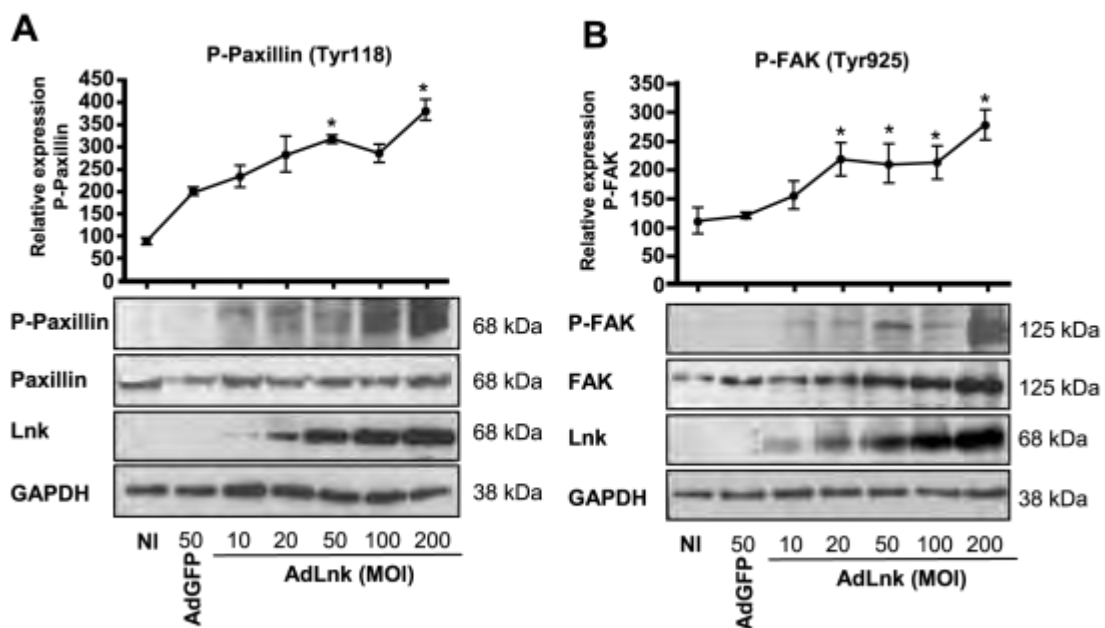


Figure 3

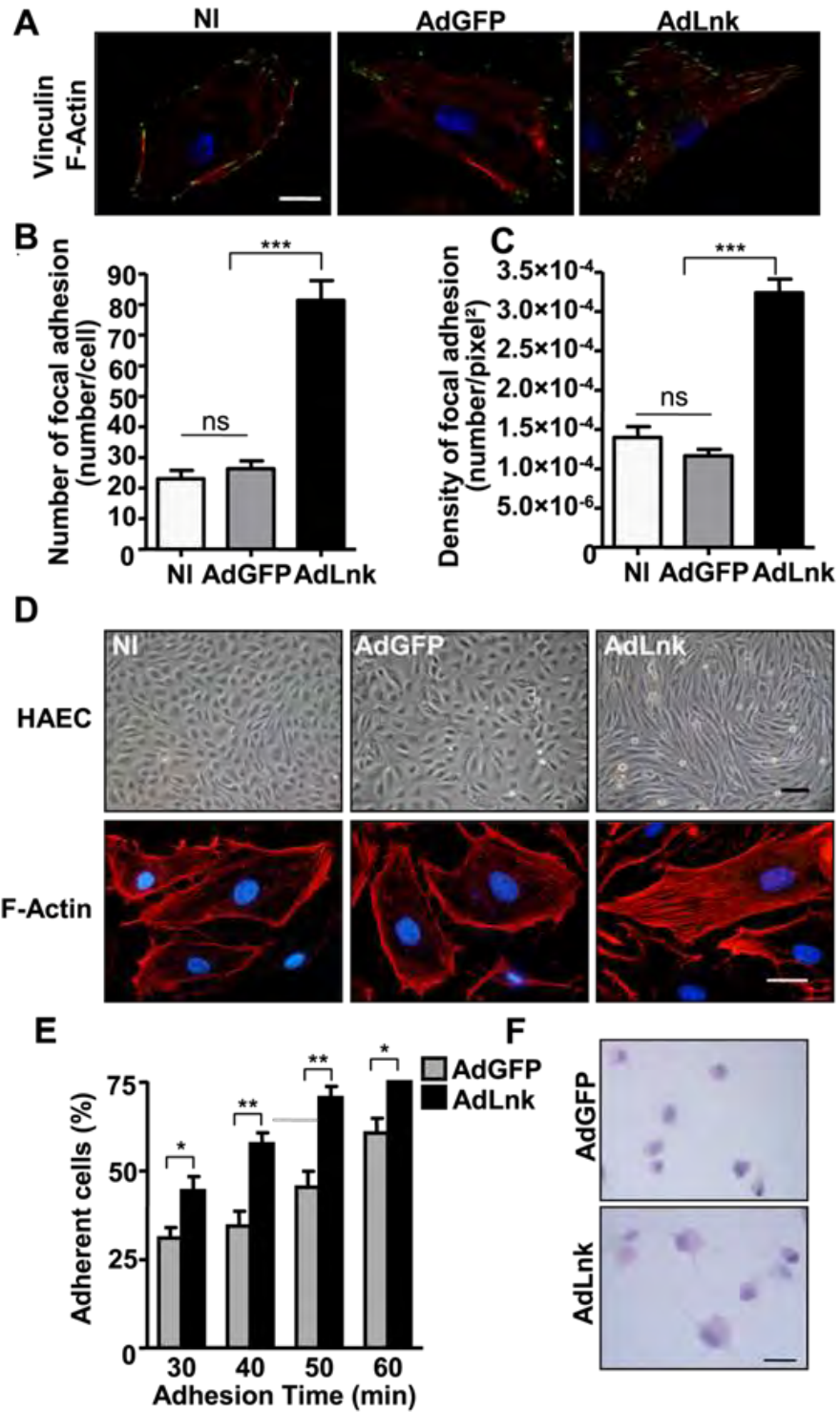


Figure 4

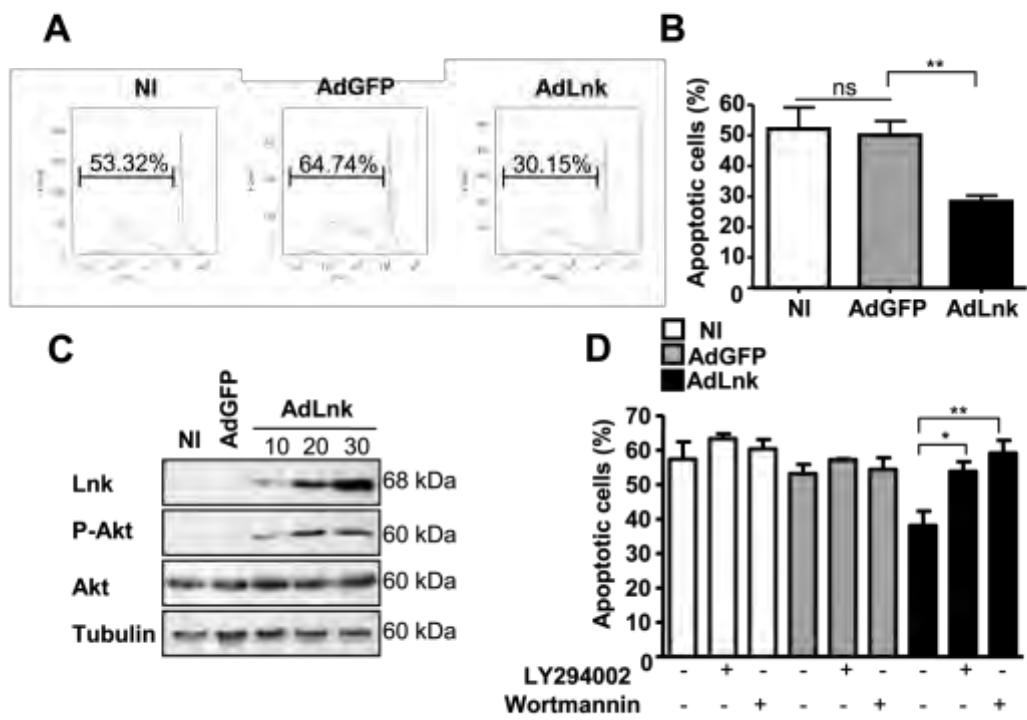


Figure 5

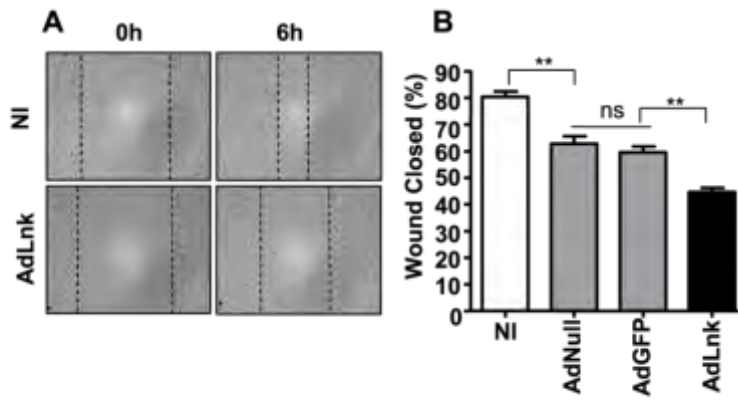


Figure 6

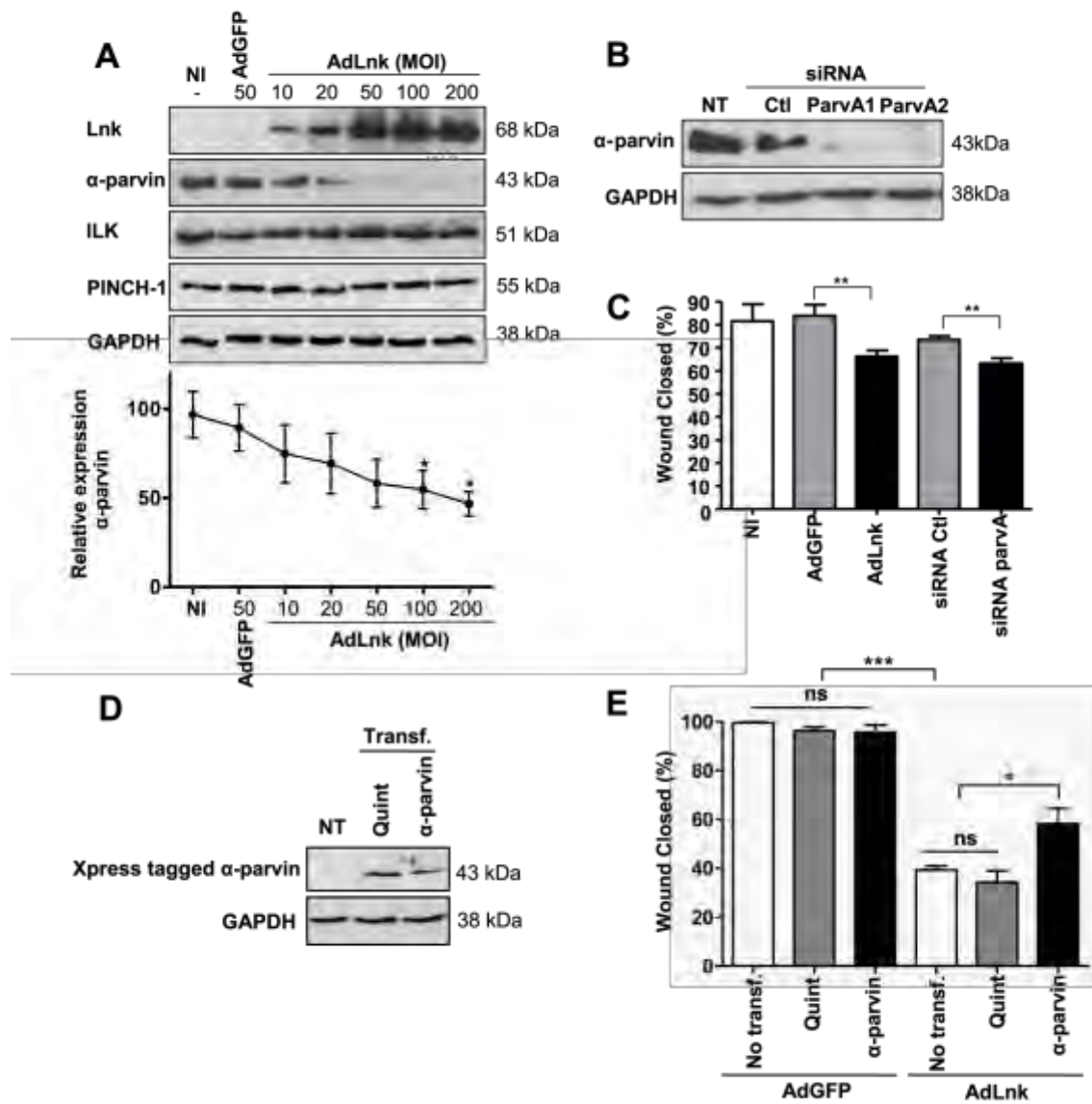


Figure 7

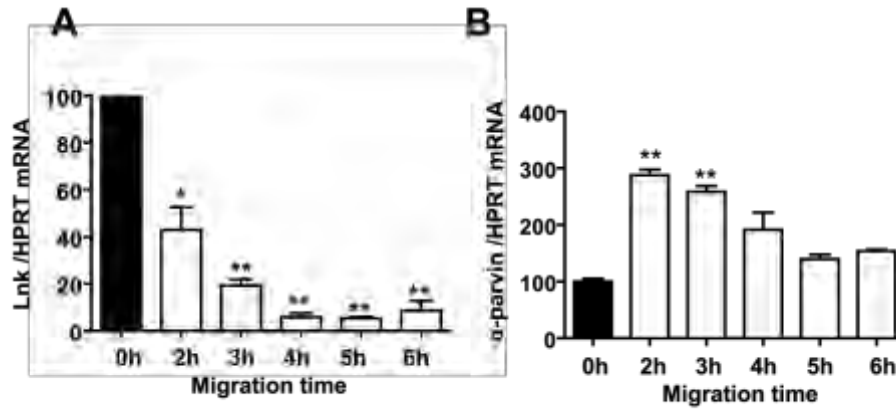
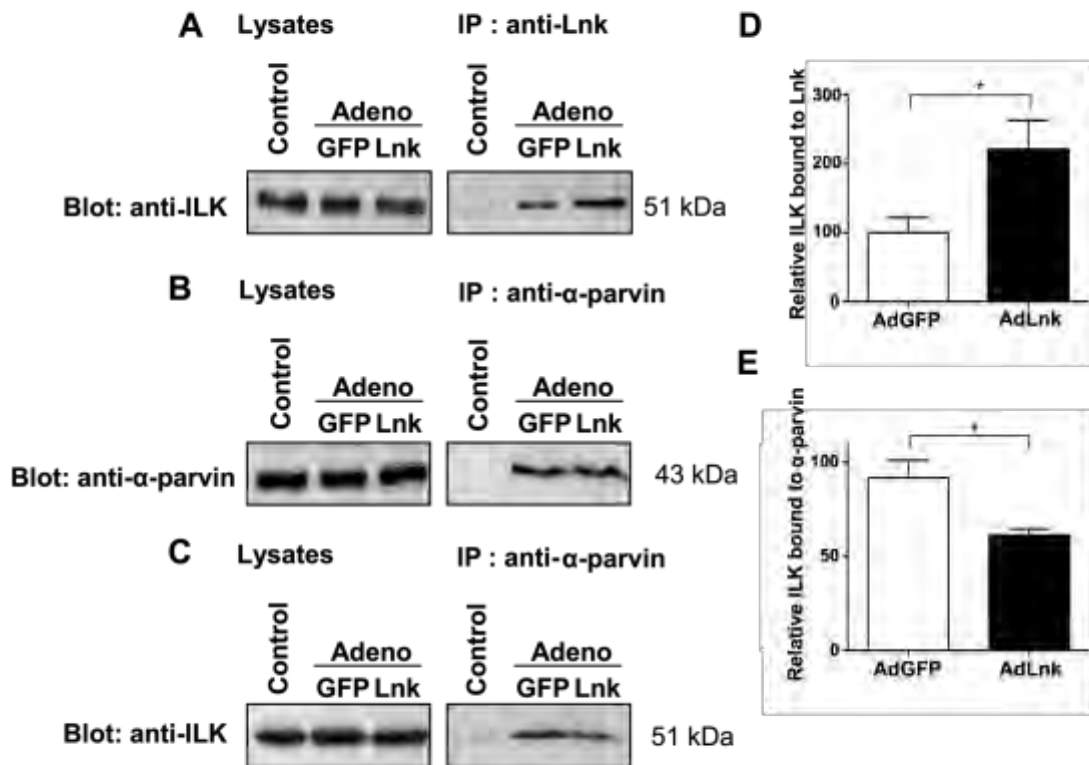


Figure 8



Partie II : Rôle protecteur de la protéine adaptatrice Lnk dans l'activation et l'apoptose des CE porcines

La xénotransplantation a été étudiée dans le passé comme une thérapeutique acceptable permettant de pallier la perte d'un organe chez l'homme par la greffe de cellules ou d'organes provenant d'une espèce animale différente. Cependant, la deuxième moitié du XX^{ème} a vu le développement de l'hémodialyse comme traitement substitutif efficace de l'insuffisance rénale terminale et la constante amélioration des résultats en allotransplantation. Ces deux progrès ont rendu la xéno greffe obsolète car moins prometteuse. Aujourd'hui, ce concept est à nouveau envisagé en raison de la pénurie croissante de greffons humains et ces dernières années ont marqué le renouveau de la recherche dédiée à l'utilisation chez l'homme, d'organes d'origine animale.

Même si les primates non humains, comme les chimpanzés et les babouins, sont phylogénétiquement plus proches de l'homme, le porc est considéré comme l'espèce animale la plus adaptée au don d'organe. En effet, les organes du porc sont physiquement et physiologiquement proches de l'homme et l'élevage de cet animal est facile et maîtrisé. De plus, le porc est depuis longtemps domestiqué et fait l'objet d'un élevage industriel. De ce fait, son utilisation serait certainement mieux acceptée par le public que le recours à des babouins. Au-delà des difficultés éthiques, le fort risque de transmission virale, ainsi que la disparité dans la taille des organes et la difficulté de leur élevage, ont définitivement éliminé les primates en tant que donneur d'organe (Cooper et al., 2002).

Le modèle préclinique porc/primate, a permis de tester la compatibilité des organes porcins (Séveno et al., 2005). Chez le macaque, la greffe rénale d'origine porcine permet le maintien des électrolytes sériques (sodium, potassium, calcium, chlorure) et l'obtention de concentrations normales de créatinine et d'urée pendant plusieurs semaines (Cozzi et al., 2000) (Soin et al., 2001). Concernant la transplantation hépatique, la greffe de foie de porc transgénique a permis la survie de deux babouins pendant 4 et 8 jours respectivement, avec des concentrations normales de facteurs de coagulation et de fibrinogène, et une production normale de bile (Ramirez et al., 2000). Un certain nombre de cas humains nécessitant la restauration urgente des fonctions hépatiques (hépatite fulminante, agents hépatotoxiques, dysfonctionnement primaire) pourraient ainsi être traités par une xéno greffe en attendant

qu'un greffon allogénique soit disponible. Des études ont également montré que des greffes orthotopiques de cœur et de poumons permettaient la survie de primates tant que ces organes n'étaient pas rejetés (Waterworth et al., 1998) (Daggett et al., 1998). La greffe de neuroblastes fœtaux porcins a aussi été testée chez des patients parkinsoniens ou atteints de maladie de Huntington, dans un essai clinique de phase I. Un an après la transplantation, une amélioration modérée du score clinique d'évaluation avait été notée chez les patients parkinsoniens, mais pas chez ceux atteints de maladie de Huntington (Fink et al., 2000). Le porc est également l'animal choisi en transplantation clinique d'îlots de Langerhans. En effet, le taux de glucose sanguin porcine est similaire au taux humain, et l'insuline porcine est efficace chez l'homme. Si les essais cliniques de xéno greffe d'îlots pancréatiques ont connu des échecs (Groth et al., 1994), une étude rapporte une survie à long terme d'îlots porcins encapsulés, chez un homme diabétique (Elliott et al., 2007) et les résultats précliniques chez des modèles animaux sont encourageants (Hering et al., 2006). Ainsi, la transplantation d'îlots pancréatiques porcins pourrait être la première application clinique réussie en xéno transplantation.

Cependant, de nombreux obstacles s'opposent toujours à cette thérapeutique, et les barrières immunologiques à surmonter, sont supérieures à celles de l'allogreffe. Le modèle animal porc/primate a permis l'étude et la caractérisation des différents types de rejet de la xéno greffe. De plus, les techniques de modification génétique du donneur ainsi que les nouveaux résultats utilisant des porcs transgéniques et/ou KO, montrent les progrès récemment obtenus dans cette discipline.

Dans cette deuxième partie, nous avons étudié le rôle de la protéine Lnk dans le contrôle de l'activation endothéliale et dans la protection de l'apoptose induite par le TNF α ou par la cytotoxicité médiées par les anticorps xénogéniques et l'activation du complément. Les résultats sont regroupés sous forme d'un article précédé d'une présentation des définitions et enjeux actuels de la xéno transplantation.

Présentation de la xénotransplantation

I. Les différents types de rejet en xénotransplantation

1. Le rejet suraigu

Le rejet suraigu est la première barrière immunologique à la transplantation d'organes. Il est médié par les anticorps dits « naturels », car présents dans la circulation sanguine indépendamment de toute stimulation antigénique antérieure, et principalement dirigés contre la structure glycosidique Gal α 1-3Gal α 1-4GlcNAc-R, appelée épitope alpha-galactosyl (α Gal) (Galili, 1993) (Sandrin et al., 1993). L'enzyme alpha1,3-galactosyltransférase qui synthétise l'épitope α Gal, est fonctionnelle chez la plupart des espèces mais ne l'est pas chez les humains et les singes de l'Ancien Monde (tels que les chimpanzés ou les babouins). Ce motif est également exprimé par de nombreux microbes, de ce fait les hommes ainsi que les primates se trouvent couramment exposés à ces déterminants antigéniques. Ces expositions répétées expliqueraient la présence d'anticorps naturels anti- α Gal, probablement formés dès les premières années de la vie, suite à des stimulations antigéniques bactériennes au niveau du tube digestif.

Dans le cas des combinaisons porc/babouin et porc/homme, les anticorps naturels xénogéniques (ANX) sont directement responsables du rejet, ces greffes sont qualifiées de discordantes. La cible porcine des ANX chez les primates et chez l'homme, est très majoritairement constituée par le motif α Gal présent sur les protéines et les lipides à la surface des cellules porcines, en particulier à la surface des CE. Ces ANX, d'isotypes IgG et IgM, possèdent une affinité élevée et sont directement responsables du rejet suraigu (Kroshus et al., 1996). La forte densité de l'épitope α Gal permet aux anticorps de se fixer massivement à l'endothélium et d'activer le complément, qui entraîne la lyse cellulaire mais aussi une activation de type I de l'endothélium. Elle consiste en une acquisition rapide d'un phénotype procoagulant, sans activation de gènes ni synthèse de protéines. L'endothélium activé du greffon provoque l'agrégation des plaquettes, la formation de fibrine et la vasoconstriction. Cela aboutit à la thrombose vasculaire et la nécrose du greffon (Platt et al., 1990). Ce rejet, qui survient dans les minutes ou les heures qui suivent la revascularisation

de l'organe, est qualifié de rejet suraigu (HAR, *hyperacute rejection*) (Figure 24). Histologiquement, il se caractérise par des hémorragies interstitielles, un œdème et la thrombose des petits vaisseaux.

Afin de prévenir l'apparition du rejet suraigu, il est possible de dépléter les anticorps xénogéniques par plasmaphérèse ou immunoadsorption. Les inhibiteurs du complément tels que le facteur de venin de cobra (Leventhal et al., 1993), le CR1 soluble (complement receptor 1) (Candinas et al., 1996) et le sulfate de dextran (Laumonier et al., 2004) prolongent également la survie du greffon. L'activité du complément sur l'endothélium peut aussi être contrôlée par des protéines régulatrices telles que le DAF (*decay accelerating factor* ou CD55), le CD59 ou le CD46.

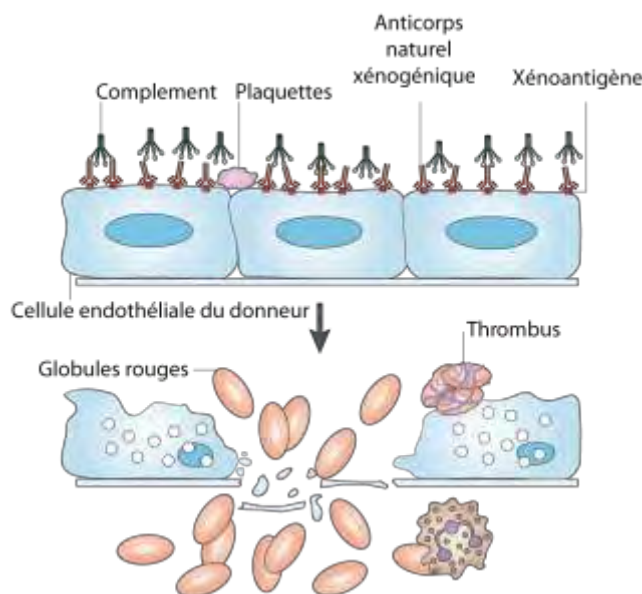


Figure 24. Rejet suraigu. La xéno greffe porcine chez un primate non traité, entraîne la réponse de rejet, initiée par la fixation des anticorps naturels xénogéniques aux épitopes xénogéniques (principalement l'épitope α Gal), suivie par l'activation du complément. La greffe est rejetée dans les minutes ou les heures qui suivent la revascularisation, en raison des hémorragies et de la thrombose vasculaire. D'après (Yang et Sykes, 2007)

2. Le rejet xénogénique retardé ou rejet aigu humoral xénogénique

Le contrôle du HAR a révélé l'existence de nouveaux obstacles immunologiques à la survie d'une xéno greffe. En effet, si le HAR est prévenu, par la déplétion des ac anti- α Gal ou l'inactivation du complément, en l'absence de tout traitement, la prolongation obtenue ne dépasse pas quelques jours, les organes étant rejetés par un mécanisme appelé rejet xénogénique retardé (DXR, *delayed xenograft rejection*) ou rejet aigu humoral xénogénique (AHXR, *acute humoral xenograft rejection*) (Figure 25). Il se caractérise par un infiltrat

cellulaire composé en majorité de monocytes (70-80%) et de cellules lymphocytaires NK (*natural killer*). Il est associé à une activation de type II de l'endothélium, conduisant à la synthèse de cytokines pro-inflammatoires (interleukines 1 et 8) et de molécules d'adhésion comme VCAM-1, ICAM-1 et la E-sélectine, ainsi qu'à l'acquisition d'un phénotype procoagulant. De plus, la fixation des IgG sur l'endothélium peut non seulement activer le complément, mais aussi induire l'ADCC (*antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*) par l'activation des cellules NK *via* une interaction entre le fragment Fc des IgG et le FcγRIII de ces cellules (Schaapherder et al., 1994).

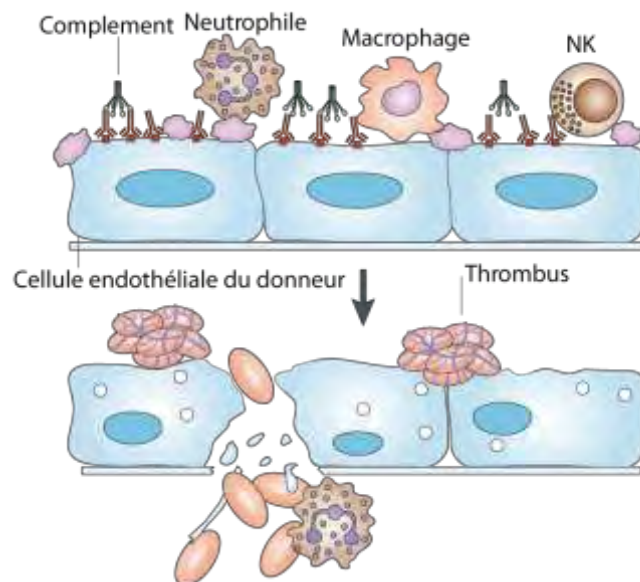


Figure 25. Rejet xénogénique retardé ou rejet aigu humoral xénogénique. Ce rejet intervient lorsque le HAR est évité. En plus des processus décrits dans le HAR, il est induit par la présence de neutrophiles, de macrophages et de cellules NK, médiant l'ADCC. L'ensemble aboutit à l'activation endothéliale, la thrombose et la vasoconstriction. D'après (Yang et Sykes, 2007)

Lors du DXR, on observe de façon concomitante une forte augmentation du titre sérique des anticorps xénoréactifs IgM et IgG. Ces anticorps sont principalement dirigés contre l'épitope α Gal, mais également contre d'autres épitopes porcins (Dehoux et al., 2002). Dans le cas d'une déplétion des ac anti- α Gal, un très faible taux d'ac anti- α Gal, nouvellement formés, mais aussi la présence d'autres ANX peuvent entraîner le DXR. De nombreuses études s'attachent à identifier un ou plusieurs antigènes porcins non α Gal, qui seraient la cible d'ac préformés chez les primates. Les porcs expriment d'autres structures glycosidiques comme l'acide N-glycolyl neuraminique (NeuGc) à la surface de leur endothélium (Bouhours et al., 1996). Il a été montré que l'homme possède également dans son sérum des ac naturels contre cet épitope NeuGc (Zhu et Hurst, 2002), cependant leur rôle dans le DXR reste à ce jour indéterminé (Miwa et al., 2004) (Komoda et al., 2005).

La microangiopathie thrombotique (MAT) et la coagulation intravasculaire disséminée (CIVD) sont des composantes physiopathologiques majeures du DXR, initiées par la perte des propriétés anticoagulantes de l'endothélium (Gollackner et al., 2004) (Houser et al., 2004). Cette dérégulation de la coagulation est principalement due à des incompatibilités entre les systèmes de coagulation du porc et de l'homme, en particulier entre la TM porcine et la thrombine humaine. Roussel *et al.* ont récemment montré *in vitro* que la TM de porc se lie à la thrombine humaine et inhibe partiellement son activité procoagulante (Roussel et al., 2008). Cependant, la TM serait un cofacteur peu efficace de l'activation de la protéine C humaine, un inhibiteur clé de la coagulation. A ce jour, la thrombose microvasculaire est la barrière principale à la survie à long terme de la xéno greffe porc/primate (pour revue (Cowan, 2007)).

3. Le rejet cellulaire

Au-delà de l'implication du système immunitaire humorale, les réponses cellulaires participent également au rejet des organes porcins dans les modèles de primates. Cependant, elles restent pour le moment mal définies en raison de la difficulté à maîtriser les rejets HAR et DXR. Il a été montré que les lymphocytes T sont capables de reconnaître et d'attaquer les cellules endothéliales porcines, soit directement, soit par l'intermédiaire des cellules présentatrices de l'antigène (CPA) de l'hôte (Figure 26). Les CE activées surexpriment les antigènes du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I et synthétisent *de novo*, ceux de classe II. Les CE porcines participent ainsi directement à l'activation des lymphocytes T du receveur. De plus, contrairement à l'homme, les CE porcines expriment à leur surface la molécule de costimulation B7-2 (CD86) (Maher et al., 1996), faisant d'elles des cibles permanente pour les lymphocytes humains par la voie directe de présentation xénoantigénique. *In vitro*, les lymphocytes T humains répondent fortement à la stimulation par des antigènes porcins (Dorling et al., 1996a). Une xéno greffe cardiaque dans un modèle porc/babouin, dans laquelle les ac ont été déplétés, a révélé le rôle important des lymphocytes T dans le processus de rejet (Davila et al., 2006). En accord avec cette observation, l'administration d'un traitement supprimant les cellules T, prolonge de façon significative la survie d'une xéno greffe porcine chez un primate (Yamada et al., 2005) (McGregor et al., 2005).

Les cellules NK sont activées par leur interaction avec les CE porcines. En effet, les cellules porcines expriment des ligands fonctionnels pour les récepteurs d'activation des cellules NK humaines, ainsi le ligand ULBP1 (*UL16 binding protein*) porcine, peut interagir avec le récepteur NKG2D (*natural-killer group 2, member D*) humain. Même si le ligand reste à identifier, il a également été montré que les cellules porcines peuvent activer les cellules NK humaines, par leur interaction fonctionnelle avec NKp44 (Lilienfeld et al., 2006) (Tran et al., 2008). L'incompatibilité entre les molécules du MHC de porc (nommé SLA, *swine leukocyte antigen*) et les récepteurs inhibiteurs des cellules NK humaines, rendent les cellules porcines particulièrement sensibles à la lyse médiée par les NK. De plus, les cellules NK libèrent des cytokines, comme l'IFN γ et le TNF, qui activent les macrophages et les CE et prolongent le processus inflammatoire (Gourlay et al., 1998).

Des principes similaires sont applicables aux macrophages. Les macrophages sont activés par les CE porcines, par l'intermédiaire de l'épitope α Gal reconnu par la galectine-3. L'absence d'interaction fonctionnelle entre le CD47 porcine et la protéine humaine SIRP α (*signal-regulatory protein- α*), un important récepteur inhibiteur des macrophages, rend les cellules porcines vulnérables à la phagocytose par les macrophages humains (Wang et al., 2007).

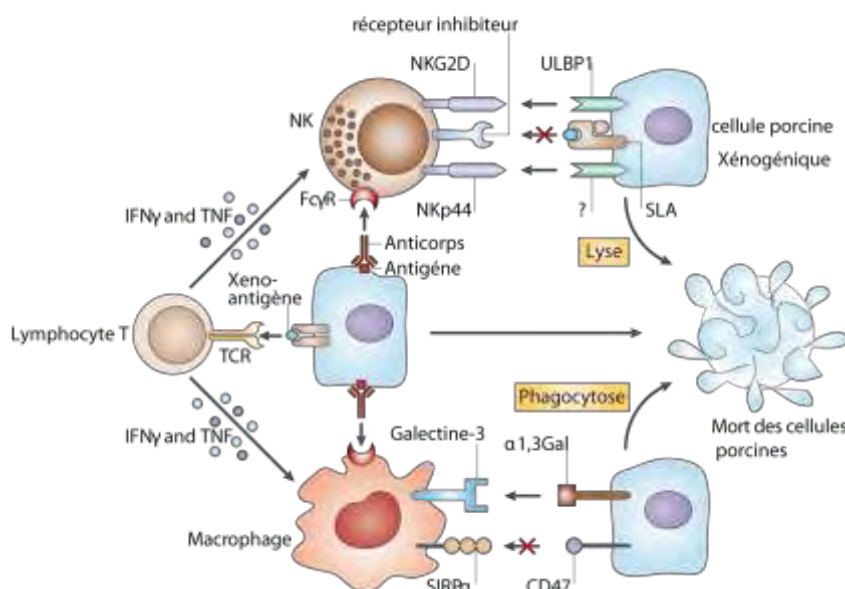


Figure 26. Rejet cellulaire. Dans le cas d'une xélogreffe, les lymphocytes T, les cellules NK et les macrophages humains sont activés par les CE porcines, aboutissant à la destruction des CE. D'après (Yang et Sykes, 2007)

II. Les

stratégies de prévention du rejet par modifications génétiques du donneur

L'identification du rôle joué par les anticorps xénogéniques naturels anti- α Gal, a permis de contourner ce première obstacle du HAR. Ainsi différentes stratégies ont été adoptées : inhiber l'activation du complément du receveur et/ou diminuer l'antigénicité des cellules porcines en éliminant l'épitope α Gal. Un des avantages majeurs du porc comme donneur d'organe, est la possibilité de modifier le génome de cet animal par des techniques modernes de génie génétique. Les caractéristiques de la reproduction du porc, notamment la gestation relativement courte et les grandes portées, ont permis la manipulation du génome du porc et l'addition d'un ou de plusieurs gène(s) (porc transgénique) ou la suppression de l'expression d'un gène (porc KO) (pour revue (Le Bas-Bernardet et al., 2008)).

a. Les techniques de manipulations génétiques chez le porc

Plusieurs techniques permettent la manipulation génétique chez les grands animaux. Parmi les plus connues, on distingue la microinjection pronucléaire, le transfert de gène médié par le sperme (SMGT, *sperm-mediated gene transfer*), la transgénèse médiée par un virus et le transfert nucléaire de cellules somatiques (SCNT, *somatic cell nuclear transfer*) (pour revue (Sachs et Galli, 2009)).

La microinjection pronucléaire est désormais rarement utilisée. Cette ancienne méthode, à faible taux de réussite, consiste en la microinjection de plusieurs copies de gènes dans l'un des deux pronoyaux d'un oeuf fécondé. Cette technique a été utilisée, par exemple, par Martin *et al.*, qui ont ainsi généré des porcs transgéniques exprimant la molécule inhibitrice humaine des lymphocytes T (hCTLA4-Ig) sous le contrôle d'un promoteur spécifique des neurones (Martin et al., 2005). L'étude de ces porcs transgéniques, destinés à la xénotransplantation de neurones, a montré une expression dans des parties variées du cerveau, incluant l'hippocampe ou le cortex.

La SMGT est une technique permettant la production de porcs multitransgéniques. Cette méthode a été récemment améliorée par Webster *et al.* qui ont incubé les gènes de trois protéines fluorescentes avec des spermatozoïdes, par la suite utilisés pour l'insémination des animaux. Ils ont ainsi obtenu 18 porcelets transgéniques dont 7 portant les trois gènes (Webster et al., 2005). Cette technique présente les avantages d'être efficace,

peu onéreuse et facile à mettre en œuvre. Néanmoins, l'insertion se fait au hasard et le transgène peut subir des réarrangements, affectant le niveau d'expression. Enfin, l'expression du transgène à long terme est controversée (Wu et al., 2008).

L'infection par un lentivirus d'oocyte, d'embryon (Whitelaw et al., 2004) ou de cellules somatiques en culture, permet également le transfert de gènes et l'obtention de 80 à 100% d'animaux transgéniques. Les lentivirus ne peuvent être utilisés en clinique en raison des risques associés aux intégrations multiples, entraînant l'activation d'oncogènes, des mutations ou l'inhibition des séquences lentivirales (Hofmann et al., 2006) par méthylation. Une autre classe de virus, utilisée pour le transfert de gène, est l'AAV (*adeno-associated virus*). Rogers *et al.* ont ainsi produit un porc KO pour le gène *CFTR* (*Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) (Rogers et al., 2008).

Enfin, le transfert nucléaire de cellules somatiques est devenu l'outil le plus utilisé pour la génération d'animaux génétiquement modifiés, d'autant que cette technique fonctionne particulièrement bien chez le porc (Lagutina et al., 2007). Le SCNT consiste en un transfert d'un noyau d'une cellule somatique, dans une cellule œuf préalablement énuclée. Le problème majeur est la durée de vie limitée des cellules somatiques, qui restreint le temps de culture *in vitro* nécessaire à leur manipulation génétique.

b. Les premiers résultats d'études utilisant des porcs transgéniques

Les premières modifications génétiques rapportées chez le porc, consistent en l'introduction d'une ou de plusieurs molécules régulatrices du complément humain (Langford et al., 1994). Les trois protéines les plus souvent utilisées, sont le DAF (Cozzi et al., 1997), le CD46 (Diamond et al., 2001) et le CD59 (Byrne et al., 1997). La particularité de la xénotransplantation réside dans la spécificité d'espèce des protéines, notamment des molécules régulatrices du complément, exprimées par les cellules endothéliales porcines, et peu efficaces pour contrôler le complément humain. Ainsi, dans la combinaison porc/homme, le DAF porcin ne peut réguler efficacement l'activation du complément humain (Dalmaso et al., 1991). Toutefois, une étude, plus récente, semble montrer que la quantité, c'est à dire le niveau d'expression des molécules régulatrices du complément, serait plus importante dans la protection de l'endothélium que la qualité, c'est-à-dire la spécificité d'espèce (Morgan et al., 2005). Ainsi, les porcs, surexprimant les molécules

régulatrices du complément porcin, seraient aussi efficaces, que des porcs exprimant ces mêmes molécules humaines.

La protéine DAF est une protéine de surface, ancrée à la membrane plasmique *via* une structure glycosylinositolphospholipide, appelée GPI (glycosylphosphatidylinositol). Cette protéine inhibe la formation de la C3 convertase par sa liaison avec C3b et C4b. Elle se lie également avec la convertase C3bBb de la voie alterne, et avec la convertase C4b2a de la voie classique, et accélère ainsi leur dégradation. La fonction de DAF est de fournir une barrière de protection contre l'activation du complément et le dépôt sur la membrane plasmique des cellules autologues, notamment par la voie classique, en limitant la formation et la demi-vie des C3 convertases (pour revue (Lachmann, 1991)) (Figure 27).

Le cofacteur membranaire CD46 (ou MCP, *membrane cofactor protein*) est une glycoprotéine transmembranaire dont l'action nécessite la présence du facteur I. Ainsi, l'association du facteur I et de son cofacteur CD46, induit le clivage des fragments C3b et C4b. La fragmentation de C3b produit le fragment C3bi, inapte à l'activation du complément. Le clivage de C4b produit les fragments C4c, libéré dans le milieu extracellulaire, et C4d, qui ne peut continuer la cascade du complément et reste fixé à la membrane (pour revue (Riley-Vargas et al., 2004)). Ainsi, l'action couplée du facteur I et de CD46, entraîne la formation de fragments incapables de former une convertase et bloque ainsi l'activation du complément (Figure 27).

La protéine de surface CD59, aussi appelée protectine est, comme le DAF, une protéine GPI. Elle protège les cellules de la lyse médiée par le complément en se liant avec C9 et en inhibant son incorporation dans le complexe C5b-9. CD59 empêche ainsi la polymérisation du complexe d'attaque membranaire, et protège efficacement les cellules de l'activation inappropriée du complément ayant échappé aux multiples inhibiteurs de l'étape C3/C5 (pour revue (Lachmann, 1991)) (Figure 27).

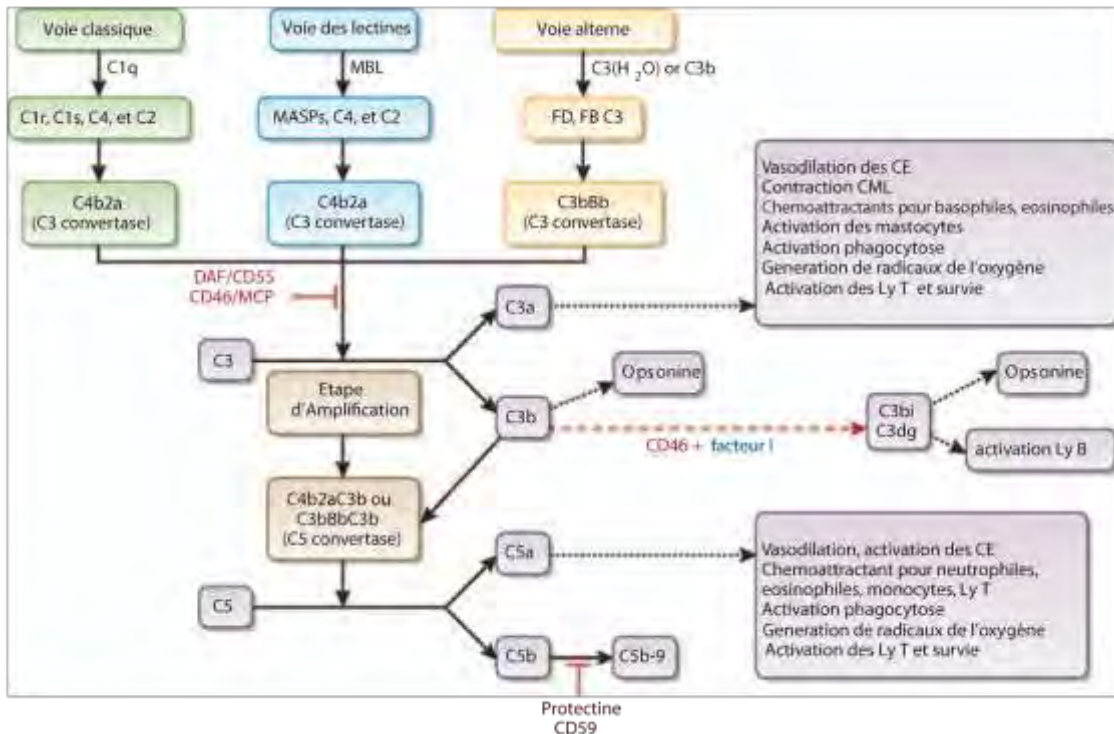


Figure 27. Schéma de la cascade du complément illustrant les trois voies d'activation (classique, des lectines, alterne). Les régulateurs du complément sont représentés en rouge (DAF, CD46 et CD59), les facteurs solubles en bleu. Le complexe d'attaque membranaire (C5b-9) ainsi que le rôle des fragments solubles sont mentionnés.

Si les premières études, utilisant des porcs transgéniques pour ces différentes protéines DAF, CD46 ou CD59, ont clairement montré une inhibition du complément, et par conséquent, une inhibition partielle de la destruction du greffon induite par le complément, aucune de ces modifications n'a permis d'éviter le rejet DXR. Ainsi, en l'absence de tout traitement, la prolongation obtenue ne dépasse pas quelques jours, les organes étant rapidement rejetés. Beaucoup d'études ont donc combiné l'utilisation des animaux transgéniques à des traitements immunosuppresseurs. En effet, la mise au point de traitements immunosuppresseurs adaptés à la situation clinique, semble également être un complément indispensable à la réussite de xéno greffes. Mc Gregor *et al.* ont ainsi obtenu une survie de 96 jours d'un cœur de porc transgénique pour le CD46, transplanté chez un babouin, en utilisant du Rituximab et de la Thymoglobuline en thérapie d'induction, associé à un régime immunosuppresseur standard incluant le tacrolimus, des stéroïdes et des inhibiteurs des ac anti- α Gal (McGregor *et al.*, 2005). Shimizu *et al.* ont rapporté une série de xéno greffes de reins porcins transgéniques pour le DAF humain, chez des babouins, traités

par le facteur de venin de cobra, associé à une déplétion des ac anti- α Gal par immunoadsorption (Shimizu et al., 2005). Ces traitements n'ont cependant pas pu empêcher la survenue du rejet xénogénique retardé, un mois post-greffe, caractérisé par le dépôt d'ac et une microangiopathie thrombotique.

Alors que les ac anti- α Gal étaient couramment considérés comme la cause majeure du rejet xénogénique retardé des xénotransplantations porc/primate, quelques études évoquaient déjà la possibilité du rôle joué par des ac non- α Gal (Chen et al., 2006). La génération et la disponibilité des porcs Gal-KO en 2005, a permis d'affiner cette hypothèse.

c. Les premiers résultats d'études utilisant des porcs Gal-KO

Le rôle prédominant des anticorps xénogéniques dans les rejets suraigu et retardé, ainsi que la difficulté de surmonter ces rejets ont conduit à suggérer, en 1993, que la suppression de l'expression du motif α Gal pourrait être une solution de choix au rejet humoral en xénotransplantation (Cooper et al., 1993). La technique du transfert nucléaire, apparue en 1996, a permis de produire en 2001 les premiers porcs hétérozygotes pour une forme inactive de l'alpha1,3-galactosyltransférase (Gal). L'année suivante, des porcs dont les deux allèles de l'alpha1-3galactosyltransférase avaient été invalidés (porcs Gal-KO) ont vu le jour (Lai et al., 2002). Les premiers résultats dans des modèles de greffes cardiaques (Kuwaki et al., 2005), rénales (Yamada et al., 2005) et pulmonaires (Schroeder et al., 2005) utilisant des porcs Gal-KO, ont montré l'absence de HAR et une survie plus longue des primates non humains transplantés.

En 2005, Chen *et al.* ont réalisé des xéno greffes rénales dans un modèle porc Gal-KO/babouins traités par immunosuppresseurs, et montré une survie modeste, d'environ 15 jours, en raison d'un rejet humoral aigu (Chen et al., 2005). Le taux d'ac non- α Gal circulants a été décuplé après la greffe, allant jusqu'à une augmentation de 26 fois le niveau initial, et entraîné l'activation et la cytotoxicité médiée par le complément. Ces travaux ont permis de confirmer le rôle des antigènes non- α Gal dans l'induction du DXR.

La même année, Kuwaki *et al.* ont obtenu une survie record de 179 jours dans un modèle porc Gal-KO/babouins de xéno greffe cardiaque (Kuwaki et al., 2005). Cette significative prolongation de la survie, semble être en partie due à un traitement immunosuppresseur mieux adapté et moins toxique. Les auteurs ont ajouté à leur protocole

immunosuppresseur, un anticorps dirigé contre le ligand CD40 (CD40L ou CD154), une protéine impliquée dans la voie de co-stimulation CD40-CD40L. Il a été montré que l'engagement du TCR avec l'antigène en l'absence de signaux de co-stimulation appropriés, peut rendre les lymphocytes T insensibles à la stimulation antigénique (anergique) et/ou induire l'apoptose. Ainsi, l'utilisation de l'ac anti-CD40L a permis de bloquer, en partie, la voie du CD40-CD40L et a contribué au maintien du faible niveau d'ANX. Cette même stratégie d'induction de tolérance des lymphocytes T, mais cette fois par l'utilisation de CTLA4-Ig inhibiteur de la voie de co-stimulation CD80/86-CD28, a également permis une amélioration du taux de survie de certaines xéno greffes (Lenschow et al., 1992). Dans l'étude de Kuwaki, des signes prononcés de microangiopathie thrombotique ont été observés chez la plupart des babouins et étaient responsables de l'ischémie et de la perte des greffons. La transgénèse porcine pourrait contribuer à contrôler ce phénomène, en particulier en permettant l'expression d'inhibiteurs du facteur tissulaire et d'antithrombine.

Yamada *et al.* ont rapporté la mise au point d'un autre protocole d'induction de la tolérance xénogénique, permettant la survie d'une xéno greffe rénale de 83 jours, la plus longue jamais observée à ce jour. La délétion des cellules T xénoréactives est obtenue par une greffe de fragments thymiques du donneur. Ces fragments peuvent être transplantés séparément du rein, ou être placés sous la capsule rénale plusieurs semaines avant le prélèvement, afin de permettre la création d'un environnement thymique vascularisé. Dans ce cas, le jour de la greffe, c'est un « thymus-rein » qui est greffé et permet la délétion des lymphocytes T xénoréactifs.

L'ensemble de ces travaux, a montré que la connaissance des cibles des anticorps non dirigés contre le motif α Gal et la compréhension des mécanismes qui sous-tendent le rejet cellulaire, sont essentielles à l'adaptation des traitements, voire à l'induction d'une tolérance du receveur vis-à-vis de son greffon. Cette tolérance xénogénique, par le contrôle des voies de co-stimulation ou par délétion thymique, pourrait permettre l'utilisation d'une immunosuppression minimale. Cette perspective revêt un intérêt fondamental, dans la mesure où les traitements immunosuppresseurs actuellement requis en xéno transplantation, sont difficilement compatibles avec la clinique humaine.

III. La protection du greffon par accommodation

1. Définition du processus d'accommodation

Le succès de la transplantation d'organe est largement dû au développement de traitement immunosuppresseur qui bloque la réponse lymphocytaire impliquée dans le rejet. Il est donc normal que beaucoup d'efforts soient alloués à la compréhension de ces mécanismes cellulaires. Cependant le devenir d'une greffe ne dépend pas uniquement de la réponse immunitaire dirigée contre elle mais également de sa capacité à se protéger par elle-même, des lésions induites par l'immunité.

Si le rôle délétère des IgM naturels dirigées contre les déterminants xénogéniques, n'est plus à démontré, celui des IgG demeure plus controversé. En effet, on sait que, dans un modèle de transplantation porc/homme, les IgG anti- α Gal participent à l'activation du complément et favorisent la lyse des CE porcines par les cellules NK humaines, suivant le mécanisme de cytotoxicité dépendant des ac. Cependant, l'incubation des cellules endothéliales porcines avec des préparations d'IgG humaines polyclonales, conduit à une protection des cellules contre l'activation du complément (Magee et al., 1995) (Dorling et al., 1996b). Les travaux de Dorling *et al.* suggèrent que les IgG xénoréactives confèrent aux cellules endothéliales une protection qui s'apparente au phénomène « d'accommodation » (pour revue (Dehoux et Gianello, 2009)). Ce phénomène a été initialement décrit dans un nombre limité de transplantations allogéniques entre individus ABO ou HLA incompatibles (Alexandre et al., 1987). Il se définit par la survie d'un greffon malgré la présence d'anticorps dirigés contre lui, et sans le recours à une prophylaxie anti-rejet. Pour expliquer l'accommodation, le groupe de F. Bach *et al.* propose, que dans certaines circonstances, le greffon n'active pas le processus proinflammatoire, mais se protège des réactions induites par les anticorps et le complément, notamment par la surexpression de gènes protecteurs durant les premiers jours post-greffe (Bach et al., 1991) (Soares et al., 1999). La xénogreffe cardiaque dans le modèle hamster/rat a été largement étudiée et a apporté la preuve directe qu'un cœur accommodé survit, malgré la présence d'ac anti-greffe, contrairement à un cœur « naïf », rejeté rapidement (Lin et al., 1999). Cette même équipe a obtenu des survies prolongées dans le modèle hamster/rat grâce à l'induction du phénomène d'accommodation (Lin et al., 2000). Pour cela, le rat receveur a subi une splénectomie et

reçu de la cyclophosphamide qui ont agi en synergie pour retarder le retour des ac. Cette thérapeutique, combinée à la pré-sensibilisation par transfusion sanguine, à l'administration de facteur de venin de cobra et de cyclosporine A, a permis une survie à long terme du greffon, en présence de complément, d'IgM et d'IgG anti-donneurs. Les auteurs attribuent la prolongation de la greffe à l'élimination des ac anti-donneur pré-existants et aux traitements ayant atténué leur retour. Ces résultats ont montré que le succès de la greffe n'était pas dû au phénomène de tolérance mais bien à un autre processus biologique, celui d'accommodation.

Les différentes recherches montrent que l'accommodation requiert plusieurs modifications concomitantes du receveur et de la greffe. Tout d'abord, la déplétion des ac anti-greffe du receveur doit être suivie d'un lent retour au niveau basal des ac après la greffe. L'endothélium du greffon doit surexprimer plusieurs gènes protecteurs tels que bcl2, Bcl-xL, A20 et HO-1 (ou hème oxygénase 1), permettant la protection des CE de l'apoptose (Delikouras et al., 2001) et la modulation de la réponse proinflammatoire (Bach et al., 1997a). Différents stimuli peuvent être à l'origine de l'expression de ces gènes protecteurs par les CE, notamment la présence de cytokines anti-inflammatoires comme les interleukines 4, 6, 10 et 13 associée à la réponse *T helper* (Th2) du receveur (Dorling et al., 2001). Enfin d'autres caractéristiques, moins bien définies, peuvent entrer en jeu comme l'inhibition du complexe d'attaque membranaire observée dans le modèle de transplantation hamster/rat (Suhr et al., 2007).

L'accommodation pourrait être reliée à la modification de la sous-classe d'ac chez le receveur. Comme Dorling *et al.*, Yu *et al.* ont observé *in vitro* que les IgG2 dirigées contre l'épitope α Gal empêchent la fixation des IgM et inhibent l'activation du complément (Yu et al., 1996). De plus, Mohiuddin *et al.* ont montré que les ac anti- α Gal d'une souris accommodée n'étaient pas cytolytiques, contrairement aux ac anti- α Gal d'une souris ayant rejeté la greffe qui induisent fortement la lyse des cellules exprimant l'épitope α Gal (Mohiuddin et al., 2003). Il a également été noté que les souris accommodées présentent une augmentation de leur sous-classe d'IgG2b. Ainsi, l'augmentation des IgG2, qui activent faiblement le complément, permettrait d'éviter les lésions induites par l'immunité humorale, en empêchant la fixation de sous-classes plus cytotoxiques.

Si le processus biologique d'accommodation représente une voie de recherche non négligeable, les données actuelles restent limitées et aucun élément ne prouve, à ce jour, que ce phénomène soit applicable au modèle porc/primate.

2. Les gènes protecteurs de l'endothélium

Dans le cas de greffe vascularisée, l'interaction physique entre le système immunitaire et la greffe, est représentée par l'endothélium vasculaire du greffon. Il a été montré que les CE participent au phénomène d'accommodation en surexprimant des gènes protecteurs codant pour des molécules anti-inflammatoires et/ou anti-apoptotiques. Cette protection est primordiale en xénotransplantation mais pourrait également jouer un rôle dans l'artériosclérose (vasculopathie du greffon) en allotransplantation. Les gènes protecteurs se définissent comme étant induits par le TNF α et ayant une action anti-inflammatoire et anti-apoptotique (Bach et al., 1997c). Ces caractéristiques leur permettent de supplanter l'effet des molécules pro-inflammatoires et ainsi de surmonter le rejet. Parmi les molécules, clairement identifiées, on peut citer les protéines A20, Bcl2, bcl-x_L, l'hème-oxygénase 1 (HO-1), A1, IAP ou iNOS.

a. La protéine A20

A20 a été identifiée pour la première fois comme un gène induit par le TNF α dans les HUVEC (Opipari et al., 1990). Le gène A20 code pour une protéine appartenant à la famille des *zinc finger protein* ou protéine « à doigt de zinc ». Ces molécules possèdent des domaines renfermant des atomes de zinc qui leur permettent, par leurs charges positives, de chélater l'ADN. Cette protéine est exprimée par de nombreux types cellulaires suite à différents stimuli tels que l'IL-1 ou la liaison avec le CD40. Il a été montré que la protéine A20 a un rôle cytoprotecteur double dans la CE, puisqu'elle présente des fonctions anti-apoptotiques mais aussi anti-inflammatoires.

Ainsi dans la CE, A20 a pour cible la voie apoptotique du TNF, elle inhibe le clivage des caspases 8 et 12 et par conséquent, l'activation des caspases 3 et 6, le cleavage de BID et la libération du cytochrome c. Par son action inhibitrice de la caspase 8, A20 protège également les cellules de l'activité du récepteur FAS et de l'apoptose induite par les NK (Daniel et al., 2004). A20 préserve donc les CE en bloquant les voies de signalisation apoptotiques initiées par les cellules immunitaires ou les cytokines inflammatoires.

De plus, A20 est un inhibiteur de l'activation du facteur de transcription NF κ B, induite par le TNF (Ferran et al., 1998), le stress oxydatif (Bubici et al., 2006) ou la voie CD40/CD40L (Longo et al., 2003). Comme décrit précédemment (partie I, inflammation), la transcription de nombreuses molécules pro-inflammatoires est sous le contrôle de NF κ B. L'inhibition du facteur de transcription NF κ B par A20, permet de diminuer l'expression des molécules d'adhésion telles que VCAM-1, ICAM-1, qui favorisent l'interaction des leucocytes à l'endothélium, les chimiokines ou CD40 et CD40L qui amplifient le processus inflammatoire. Enfin, le rôle prépondérant de A20 dans le contrôle et l'inhibition de l'inflammation, est confirmé par les souris A20^{-/-} qui développent des inflammations sévères et sont hypersensibles au LPS et au TNF, l'ensemble de ces phénomènes aboutissant à leur mort prématurée (3 semaines) (Lee et al., 2000).

b. Les membres de la famille anti-apoptotique bcl

Les gènes anti-apoptotiques *bcl* tels que *bcl-2*, *bcl-x_L* partagent les fonctions anti-apoptotiques et anti-inflammatoires de A20 dans les CE, *via* l'inhibition des facteurs de transcription NF κ B et le contrôle de l'activation des CE (Badrichani et al., 1999) (Stroka et al., 1999). Les protéines *bcl-2* et *bcl-x_L* sont co-exprimées avec A20 dans les CE et les CML des xénogreffes présentant une survie prolongée (Bach et al., 1997b). Ce résultat suggère que leur expression simultanée protège la greffe *in vivo*. Dans des conditions physiologiques, l'expression constitutive de *bcl-2* et *bcl-x_L* entretient le phénotype anti-inflammatoire et anti-coagulant des CE. En réponse à des stimuli proinflammatoires, l'induction additionnelle de l'expression de gènes cytoprotecteurs comme A20 ou A1 augmente la protection et limite ainsi les lésions et l'apoptose des CE, favorisant la prolongation de la greffe (Bach et al., 1997d). De plus, dans le cas de survie à long terme d'allogreffe, il a été montré que les CE expriment ces mêmes gènes protecteurs, au contraire de CE de greffon rejeté de façon chronique (Hancock, 1997). La diminution de l'inflammation et de l'apoptose des CE, prémunirait également du développement de l'artériosclérose.

c. L'hème-oxygénase 1

L'hème oxygénase 1 (HO-1) est une enzyme qui catalyse la dégradation de l'hème, aboutissant à la génération de monoxyde de carbone (CO), de biliverdine et d'ions

ferreux (Fe^{2+}). HO-1 est exprimée par les CE et les CML des xénogreffes présentant une survie prolongée (Bach et al., 1997d). Si elle est exprimée avant le stress, elle empêche la détérioration des cellules et des tissus. La transformation de l'hème libre par HO-1 permet de limiter de façon conséquente les effets délétères de l'hème. Cependant, la plupart des effets protecteurs de cette enzyme, est apportée par ses produits de dégradation. Le CO prévient les CE de l'apoptose, tout comme la biliverdine (Brouard et al., 2000). De plus, le monoxyde de carbone diminue la prolifération des CML et inhibe le développement de l'artériosclérose. Les produits engendrés par HO-1 affectent également la réponse immune. La biliverdine supprime la réponse des lymphocytes T en inhibant NF κ B et NF-AT, et favorise ainsi la tolérance immunitaire (Akamatsu et al., 2004). Le CO et la biliverdine présentent également de nombreuses propriétés anti-inflammatoires et anti-oxydantes (pour revue (Soares et Bach, 2007)). Ainsi, HO-1 et les molécules produites par son activité, protègent le réseau vasculaire localement mais également de façon plus générale en ciblant directement le système immunitaire.

Sans être exhaustive, cette liste de protéines montre la diversité et le rôle important de ces molécules dans la protection de la xénogreffe. L'expression de ces gènes protecteurs contrebalancerait les effets délétères de l'inflammation et de la réponse immunitaire qui s'entretiennent mutuellement. En bloquant ce cycle, le greffon pourrait acquérir un phénotype particulier, qui lui permettrait de survivre à long terme avec une immunosuppression minimale.

La production de porcs Gal-KO multitransgéniques, exprimant des molécules régulatrices du complément, des molécules prévenant la coagulation et d'autres protégeant l'endothélium, est en cours. L'action cumulée de ces molécules pourrait apporter une prolongation significative de la survie des greffons.

Article 2 : Le transfert du gène Lnk prévient les CE porcines de l'activation et de l'apoptose : implications dans la cytoprotection de la xénogreffe

Résumé de l'article :

Le rejet xénogénique retardé (DXR) ou rejet aigu humoral xénogénique (AHXR) intervient les premières semaines post-greffe, et reste le principal obstacle à la xénotransplantation. Les lésions du greffon sont majoritairement dues à l'activation et l'apoptose des CE. Une stratégie innovante dans la protection de la xénogreffe, est la modification par génie génétique des porcs et l'expression par les CE porcines de transgènes protecteurs connus pour leurs propriétés anti-inflammatoires et/ou anti-apoptotiques.

Nous avons précédemment montré que la protéine Lnk est présente dans les CE porcines et surexprimée suite à la fixation d'anticorps naturels xénogéniques ou à une stimulation au TNF α (Boulday et al., 2002). Dans cette nouvelle étude, nous avons démontré qu'un adénovirus recombinant permet la transduction efficace de l'ADNc de Lnk et l'expression de la protéine Lnk humaine dans des PAEC issues de porcs WT ou Gal^{-/-} (Gal-KO). Nous avons également confirmé que l'expression soutenue de Lnk agit dans les PAEC comme dans les CE humaines (Fitau et al., 2006), en inhibant l'expression de VCAM-1 induite par le TNF α humain. Ainsi, l'expression de la protéine Lnk humaine agit comme un inhibiteur de l'activation endothéliale porcine en diminuant l'expression des molécules d'adhésion impliquées dans l'acquisition d'un phénotype pro-inflammatoire. De plus, l'utilisation du marquage de la fragmentation de l'ADN par l'iodure de propidium, a montré que l'expression de Lnk protège les PAEC de la mort cellulaire par anoïkis. Enfin, le transgène Lnk diminue l'apoptose médiée par le TNF α , caractérisé par la diminution de l'activité des caspases 3 et 7 dans les PAEC transduites.

Ces résultats font de Lnk une molécule adaptatrice particulièrement prometteuse dans la cytoprotection des greffons en préservant les cellules de l'apoptose et de l'activation endothéliale.

Gene transfer of the adaptor Lnk (SH2B3) prevents porcine endothelial cell activation and apoptosis: implication for xenograft's cytoprotection

Running title: Lnk protects pig endothelial cells from activation and apoptosis

Mathias Chatelais^{1*}, Julie Devallière^{1*}, Cesare Galli^{2,3} and Béatrice Charreau¹

¹INSERM, UMR634, Nantes, France ; ITERT, Institut de Transplantation Et de Recherche en Transplantation, CHU, Nantes, France ; Université de Nantes, UFR de médecine, Nantes, France.

²AVANTEA, Cremona, ³Clinical Veterinary Department, University of Bologna, Italy

*both authors equally contribute to the work.

Address correspondence to Dr. B. Charreau, PhD, INSERM UMR643, CHU Hôtel Dieu, 30 Bd Jean Monnet, 44093 Nantes cedex 01, France.

Tel: +33 240 087 416.

Fax: +33 240 087 411.

E-mail: Beatrice.Charreau@univ-nantes.fr

[Xenotransplantation](#). 2011 Mar;18(2):108-20. doi: 10.1111/j.1399-3089.2011.00629.x.

Gene transfer of the adaptor Lnk (SH2B3) prevents porcine endothelial cell activation and apoptosis: implication for xenograft's cytoprotection.

[Chatelais M](#), [Devallière J](#), [Galli C](#), [Charreau B](#).

Source : INSERM, UMR634, Nantes ITERT, Institut de Transplantation Et de Recherche en Transplantation, CHU, Nantes Université de Nantes, UFR de médecine, Nantes, France AVANTEA, Cremona Department of Clinical Veterinary, University of Bologna, Bologna, Italy.

Abstract

Background: Targeting protective gene expression to porcine endothelium by genetic modification of the donor could improve xenograft survival by controlling cell activation and death. We previously found that, in endothelial cells (EC), the molecular adaptor Lnk (SH2B3) is a negative regulator of cytokine signaling. We also have shown that Lnk is upregulated in pig EC (PAEC) in response to tumor necrosis factor- α (TNF) and xenoreactive natural antibodies (XNA) binding. The present study investigated whether ectopic expression of human Lnk using gene transfer may be efficient to control signaling pathways associated with inflammation and apoptosis in porcine aortic endothelial cells (PAEC). **Methods:** Endothelial cells cultures were established from WT and Gal(-/-) pigs and transduced with a recombinant adenovirus encoding human Lnk. Phenotype and functions of transduced PAEC expressing Lnk were analyzed by flow cytometry, western blot and XNA and complement-dependent assays. The regulatory functions of Lnk toward inflammation were assessed in TNF-activated EC, and the protective functions were tested toward TNF-induced apoptosis and anoikis. Apoptosis assays included DNA content analysis and caspase-3/7 activity. **Results:** First, we found that as a result of adenoviral transduction, human Lnk was efficiently and similarly expressed in EC from WT or Gal(-/-) pigs. Lnk expression or EC transduction caused no significant change in the binding of XNA (IgG and IgM) to PAEC and has no effect on complement activation and C5b-9 formation. We demonstrated that expression of human Lnk efficiently inhibits TNF signaling in PAEC and decreases VCAM-1 induction by $46.3 \pm 1.2\%$ compared to controls ($n = 6$, $**P < 0.01$). Furthermore, expression of Lnk was associated with a significant decrease in the percentage of caspase-3/7-dependent apoptosis caused by TNF in the presence of actinomycin D and also reduces cell death by anoikis by $25.0 \pm 1.9\%$ compared to controls ($n = 5$, $**P < 0.01$). **Conclusions:** Together, these findings indicate that the signaling adaptor Lnk is effective to reduce PAEC activation and apoptosis. Thus, Lnk is a potential candidate for the modulation of signaling pathways to protect vascular EC from inflammation in xenotransplantation.

© 2011 John Wiley & Sons A/S.

PMID: 21496118

Abstract

Background: Targeting protective gene expression to porcine endothelium by genetic modification of the donor could improve xenograft survival by controlling cell activation and death. We previously found that, in endothelial cells (EC), the molecular adaptor Lnk (SH2B3) is a negative regulator of cytokine signaling. We also shown that Lnk is up-regulated in pig EC in response to TNF and xenoreactive natural antibodies (XNA) binding. The present study investigated whether ectopic expression of human Lnk using gene transfer may be efficient to control signaling pathways associated in inflammation and apoptosis in porcine EC.

Methods: EC cultures were established from WT and *Gal*^{-/-} pigs and transduced with a recombinant adenovirus encoding human Lnk. Phenotype and functions of transduced pig EC expressing Lnk were analyzed by flow cytometry, Western blot and complement-dependent cytotoxicity. The regulatory functions of Lnk toward inflammation were assessed in TNF-activated EC and the protective functions were tested toward TNF-induced apoptosis and anoikis. Apoptosis assays included DNA content analysis and caspase-3/7 activity.

Results: Firstly, we found that as a result of adenoviral transduction, human Lnk was efficiently and similarly expressed in EC from either WT or *Gal*^{-/-} pigs. Lnk expression or EC transduction caused no significant change in the binding of XNA (IgG and IgM) to porcine EC and has no effect on complement-dependent cytotoxicity. We demonstrated that expression of human Lnk efficiently inhibits TNF signaling in pig EC and decrease VCAM-1 induction by $46.3 \pm 1.2\%$ compared to controls (** $p < 0.01$). Furthermore, expression of Lnk was associated with a significant decrease in the percentage of caspase-3/7-dependent apoptosis caused by TNF in the presence of actinomycin D and also reduces cell death by anoikis by $25 \pm 1.9\%$.

Conclusions: Together, these findings indicate that the human signaling adaptor Lnk is effective as a cytoprotective molecule which prevents pig EC from inflammation and apoptosis. Thus, Lnk is a potential candidate for modulating signaling pathways to protect vascular EC in xenotransplantation.

Introduction

A shortage of human organs has accelerated research concerning the possibility of using nonhuman donors for transplantation. Pigs are the most likely species for clinical xenotransplantation because of their similarity to humans (1). Several approaches have been developed to prevent hyperacute rejection (HAR), caused by the presence of the carbohydrate epitope galactose- α 1,3-galactose (α Gal) on the pig vascular endothelium, and mediated by human natural anti- α Gal antibodies. HAR is currently restrained by the breeding of pigs that do express human regulators of complement activation (i.e. CD46, CD55, CD59) or/and that do not express α Gal epitope (2). The latter can be achieved by knocking out (KO) the gene for the enzyme α 1,3-galactosyltransferase using nuclear transfer and embryo transfer techniques (3). Such genetic engineering of the pig donors clearly allows an improved xenograft survival in pig-to-primate experimental model (4) (5). Nevertheless, the appearance of a strong adaptive anti-pig humoral response directed against non α Gal epitopes still coincides with consummative coagulation, complement activation and endothelial cell (EC) injury that lead to xenograft thrombosis (6) (7) (8). Thus, acute humoral vascular xenograft rejection (AHXR) occurring within the first few weeks after transplantation remains the major immunological barrier to the long term survival of xenografts.

Several studies attribute graft injury in AHXR to both activation and death of vascular EC in the graft (9) (7). Endothelial cell death can cause the loss of vascular integrity, exposure of thrombogenic matrix, and loss of endothelial functions, such as the control of coagulation and inflammation. Endothelial cell activation can also contribute to graft injury, by being associated with a shift from an anticoagulant into a procoagulant state. EC activation also promotes inflammation by the dysregulation and/or *de novo* expression of a broad set of adhesion molecules (E-selectin, ICAM-1, VCAM-1), cytokines (IL1, IL6, IL8) and chemokines (MCP1, Rantes) that trigger and alter adhesion and trafficking of immune cells through the graft (10). Therefore, innovative strategies are still needed to overcome the induced anti-pig antibody production post-transplantation and to protect vascular pig EC from activation and death.

In this study, we established the protective effect of an adaptor molecule, Lnk, to functionally prevent pig EC isolated from wild type and *Gal*^{-/-} pigs from activation and death mediated by human TNF. Lnk (SH2B3) is a signaling adaptor molecule that plays regulatory

functions in the homeostasis and proliferation of immune cells (11) (12) (13) (14). We previously found that Lnk is also expressed in human and pig EC and up-regulated in activated pig EC in response to TNF and xenoreactive natural antibodies (XNA) binding (15). We further demonstrated that, in human EC, Lnk is a negative regulator of TNF signaling that inhibits CAM expressions in response to TNF (16). Here, we show that a recombinant adenovirus allows an efficient gene transfer of Lnk in cultured PAEC and we demonstrate that human Lnk is a potent cytoprotective molecule that prevents pig EC from inflammation and apoptosis.

Material and methods

Reagents and antibodies- Goat polyclonal anti-Lnk antibody was obtained from Serotec (Cergy St Christophe, France) (1:500 dilution). Mouse anti-GAPDH antibody from Chemicon (Temecula, USA) was used to quantify total protein (1:1000 dilution). Horseradish peroxidase conjugated anti-mouse (1:2000 dilution) from Cell Signaling Technology (CST, Ozyme, St Quentin Yveline, France) and anti-goat IgG antibodies (1:500 dilution) from Serotec, were both used as secondary antibodies. Goat anti-human C5b-9 antibody (1:500 dilution) was purchased from Calbiochem (Merck Chemicals, Beeston, UK) and secondary donkey anti-goat IgG Alexa 647 antibody from Invitrogen (Invitrogen, Cergy pontoise, France). Human serum AB group was issued from a pool (n=150) of male healthy donors purchased from Biowest (ABCys s.a, Paris, France) and rabbit complement (dilution 1:6 in DMEM Free) was obtained from CRTS (EFS, Nantes, France). Human recombinant TNF α and actinomycin D were purchased respectively from Miltenyi (Miltenyi Biotec SAS, Paris, France) and Sigma-Aldrich (Lyon, France).

Generation of Gal knock out pigs- PAEC were isolated from wild type (WT) and homozygous *Gal*^{-/-} pigs. *Gal*^{-/-} pig line (17) was generated from fibroblasts kindly provided by Pr. David Sachs (MGH, Boston, MA) by somatic cell nuclear transfer (SCNT) as previously reported (18) (19). All procedures were approved by Avantea local Ethics Committee and carried out according the Dlgs 116/92 regulating the use of animal in scientific research in Italy

Porcine Endothelial Cell Isolation, Culture and Activation- PAECs were isolated by digesting pig aorta in collagenase A (2.2 U/mL, Roche, Meyland, France) for 35 min at 37°C. Detached cells were incubated with dynabeads coated with an anti-CD31 antibody (Dynal, Invitrogen, France) for 20 min at 4°C. After magnetic selection and three washes, PAECs were seeded on culture dishes (Beckton Dickinson, Le pont de Claix, France) pre-coated with 1% gelatin. PAECs were grown in early passages (2-6) in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), Glutamine (200mM), Penicillin and Streptomycin (100 UI/mL) at 37 °C in a 5% CO₂. Activation assays were performed in six-well plates using confluent EC monolayers.

Recombinant Adenoviruses– pcDNA3hLnk containing the cDNA coding for human Lnk was a kind gift from Dr Jun Hayashi (School of Pharmacy, University of Maryland, Baltimore, MD, USA). The pShuttleCMV-Lnk-IRES-eGFP vector was constructed as we previously described (16). Briefly, the recombinant adenovirus AdLnk was produced in the human embryonic kidney 293 cells by the vector core laboratory of the University Hospital of Nantes (INSERM ERM-0105 Gene Therapy Laboratory, Nantes, France). The recombinant adenovirus AdTrack-GFP was used as a control (AdGFP). For experiments, PAECs were cultured in six-well plates at 70% confluence and infected with a multiplicity of infection from 50 to 200 infectious particle (MOI)/cell for AdLnk and 25 AdGFP. Adenoviral infection was carried out for 4 h in DMEM supplemented with 1% FBS at 37 °C, 5% CO₂. Complete medium containing 10% FBS was added to stop infection.

Flow cytometry- After treatment, confluent cells were harvested with trypsin/EDTA (Gibco, France) and washed in PBS, 1% BSA and 0.01% sodium azide at 4°C. The cells were incubated with human serum, VCAM-1 antibody (clone 8A12, Nantes, France), CD31 antibody (clone LCI-4, Serotec, France) or FITC conjugated BSI-B₄ (Sigma-Aldrich) for 30 min on ice. After washing in PBS, 1% BSA and 0.01% sodium azide, cells were stained with donkey anti-mouse IgG Alexa 647 (1/400, IgG, Invitrogen) and serum immunoglobulins were detected with goat anti-human IgG or IgM from Jackson Immunoresearch (JIR, UK). Infected cells were fixed with paraformaldehyde 1% for 30 min. Fluorescent labeling was measured using a BD FACSCantoII[®] cytometer (BD Biosciences, Franklin Lakes, USA) and analyzed with FlowJo[®] 7.2.5 software (Tree Star, inc.). Data are represented as median or percentage of fluorescence.

Cell Lysis Western Blot Analysis- Cell lysis was performed on ice in 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, and 1% Nonidet P-40 diluted in PBS in the presence of the following protease inhibitors (4-(2-aminoethyl)benzenesulfonyl fluoride (AEBSF), E-64, bestatin, leupeptin, aprotinin, and sodium EDTA (Protease Inhibitor Cocktail, Sigma-Aldrich). Protein concentration was determined using BCA protein assay reagent (Pierce, Rockford, IL). Cell lysates were resolved by SDS–PAGE (10%) and proteins were transferred to nitrocellulose membranes (ECL Hybond[™]; Amersham, UK) using a Trans-Blot SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad). Then, membranes were subjected to immunoblot analysis using the primary antibodies described above and appropriate peroxidase-conjugated secondary antibodies. Antibody-bound proteins were detected using an enhanced

chemiluminescence kit (ECL, Amersham) and luminescent image analyzer LAS-4000 (Fujifilm, Tokyo, Japan). Image analysis and blot quantification was performed with Multi Gauge software (Fujifilm). Results shown are representative of at least three independent experiments.

Complement-dependent Cytotoxicity Assay- Confluent cells were harvested with trypsin/EDTA, washed in PBS, 1% BSA and 0.01% sodium azide at 4°C and incubated with human serum for 30 min at 4°C. After three washings, cells were incubated with rabbit complement for 40min at 37°C in 5% CO₂. Cells were washed third in PBS, 1% BSA and 0.01% sodium azide and stained with polyclonal goat anti-human C5b-9 antibody (1/500). Primary antibody binding was detected using donkey anti-goat Alexa 647 antibody (1/400). Controls were achieved using serum or complement alone. Fluorescent labeling was measured using a BD FACSCantoII[®] cytometer (BD Biosciences) and analyzed with FlowJo[®] 7.2.5 software (Tree Star, inc.).

Apoptosis Assays

- ***Anoikis and DNA content-*** Cells were plated for 18 h in 12-well plate pre-coated with polyHEMA (Sigma Aldrich). Cellular DNA content analyses were then performed by flow cytometry as follows. ECs were harvested, washed twice in PBS, fixed in ice-cold 70% ethanol and incubated for at least 24 h at 4°C. Fixed cells were then stained with 20 µg/ml Propidium Iodide (PI), 10 µg/ml RNase A (Sigma-Aldrich), 1 mg/ml glucose in PBS (1 ml/2 x 10⁵ cells). Fluorescence was measured on 10 000 cells/sample using a BD FACSCantoII[®] cytometer (BD Biosciences, Franklin Lakes, USA) and analyzed with FlowJo[®] 7.2.5 software (Tree Star, inc.). Results shown are representative of at least three independent experiments.

- ***Measurement of caspase activity-*** The cell-permeable fluorogenic substrate PhiPhiLux-G2D2 (OncoImmunin, Gaithersburg, MD) containing the cleavage site DEVD was used to monitor caspase-3-like activity in apoptotic cells. After treatment, ECs were incubated with the substrate solution (dilution 1:10) at 37°C. Caspase-3 activation/apoptosis was followed during 22h by time lapse imaging using a microscope DMI6000B (Leica Microsystems SAS, Rueil Malmaison) equipped with an objective lens X10 (HCX FL Plan), and a CCD camera (Coolsnap HQ2, Photometrics Roper Scientifics SAS Evry). Caspase-3/7

positive cells/field were counted every 2 h between 24h and 48h post-infection with Adlnk or control AdGFP in presence or not of TNF α (800 UI/mL) and Actinomycin D (0,61 μ g/mL). Data were analysed using MetaMorph Offline 7.0 software (Molecular devices). Results were expressed as the number of caspase-3/7-positive ECs and are representative of at least three independent experiments.

Statistical Analysis- 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 parametric analysis of variance test as appropriate. $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

Expression and regulation of endogenous Lnk in porcine EC from wild type and Gal^{-/-} pigs.

The use of pigs knock out for the galactosyl transferase (*Gal^{-/-}* pigs) is, although not sufficient, a requisite step for the ultimate use of genetically modified pigs as organ donors in humans. However, since additive protective strategies are still needed, generation of multitransgenic pigs are being generated on the *Gal^{-/-}* background. Consequently, we decided to explore the potential of Lnk to protect EC from dysfunction using primary cultures of EC isolated from both WT and *Gal^{-/-}* pigs. Porcine aortic EC (PAEC) have been isolated and a phenotypic analysis of primary cultures from WT and *Gal^{-/-}* pigs was performed by flow cytometry (**Figure 1A**). Our results indicated that both WT and *Gal^{-/-}* PAEC cultures consistently express CD31 (>95% of CD31^{positive} cells), an endothelial cell marker. Surface expression of α Gal epitope was analyzed by staining with the isolectin-B₄, which specifically binds α Gal residues. As expected, α Gal expression was only detected on PAEC from WT but not on PAEC from *Gal^{-/-}* pigs. Endogenous expression of porcine Lnk in PAEC was investigated by flow cytometry after intracellular staining. **Figure 1B** clearly shows that PAEC from WT or *Gal^{-/-}* express similar basal levels of Lnk. Consistent with our previous data (15), we also found that recombinant human TNF upregulates Lnk in porcine EC. Western blotting indicates that TNF stimulation causes a rapid increase in Lnk protein level with a maximal effect at 30 min (**Figure 1C**). Similar regulation was obtained on EC from WT and *Gal^{-/-}* pigs (data not shown). Together, these data support the hypothesis that the signaling adaptor Lnk is activated and regulated in PAEC in response to TNF and may play a role in the negative control of TNF signaling as we demonstrated for human Lnk (16).

Adenoviral-mediated gene transfer efficiently achieves human Lnk expression in primary PAEC cultures.

We used an adenoviral vector to induce the ectopic expression of the human adaptor protein Lnk in porcine ECs isolated from WT and *Gal^{-/-}* pigs. This vector includes an internal ribosome entry site (IRES) sequence that allows the concomitant translation of both human Lnk and GFP reporter cDNAs from a single promoter. Therefore, expression of GFP in transduced cells strictly correlates to Lnk expression. To define the optimal conditions of infection, EC were infected with increasing multiplicity of infection (MOI) of AdLnk and GFP level was assessed by flow cytometry. An MOI of 200/cell was found to be optimal for achieving high level of expression in PAEC without causing significant cytotoxicity (**figure**

2A), consistent with previous studies in PAEC (20). Transgene expression was further confirmed by Western blotting using anti-Lnk antibody and was found significant 6h post-infection and maximal at 10h (**figure 2B**). Ectopic expression of Lnk in cells infected was further analyzed by intracellular staining and quantified by FACS. Our data show that transduced cells have a 3.7- and 3.9-fold increase in Lnk expression as compared to basal level in WT and *Gal^{-/-}* cells, respectively (**figure 2C**). For control, PAEC were transduced with an adenovirus encoding GFP alone (AdGFP) to account for any effects that may be due to adenoviral infection and/or GFP expression. As reported in **figure 2C**, transduction with AdGFP induced no change in Lnk expression. These findings demonstrate that as a result of adenoviral transduction, Lnk was similarly expressed in PAEC from either WT or *Gal^{-/-}* pigs.

Gene transfer of Lnk does not change cytotoxicity mediated by human anti-pig antibodies and complement.

A major challenge to control xenograft rejection is to limit cell lysis induced by XNA binding and complement activation. Consequently, we sought to determine whether transduction of human Lnk using a recombinant adenovirus could impact on cytotoxicity mediated by human antibodies and complement. To test this hypothesis, PAEC were transduced with AdLnk, or AdGFP as a control, and then challenged using an antibody and complement-dependent cytotoxicity (CDC) assay. To this aim, 24h after cell transduction, PAEC were incubated with normal human serum as a source of XNA and complement for 40min. Cellular cytotoxicity was measured by C5b-9 immunostaining using flow cytometry. In these conditions, WT PAEC were consistently lysed ($74.2 \pm 3.6\%$ lysis) whereas no significant lysis of *Gal^{-/-}* PAEC was found ($13.3 \pm 3.6\%$ lysis) (**Figure 3A**). Consequently, CDC assays with XNA were performed further using WT PAEC as cellular targets. When cytotoxicity was compared on control (Ni: non infected) PAEC and PAEC transduced with human Lnk or GFP we found no significant difference in antibody and complement-dependent cell lysis (**figure 3B**). Consistent with these results, we also found that either Lnk expression or PAEC transduction caused no significant change in the binding of XNA (IgG and IgM) to porcine EC (**figure 3C**).

Gene transfer of human Lnk in PAEC inhibits inflammatory gene expression.

Our previous studies showed that expression of Lnk inhibited the induction of the cell adhesion molecules (CAM) E-Selectin (CD62E) and VCAM-1 in human EC in response to human TNF (16). In this study, we sought to determine whether this protective, anti-inflammatory, effect also occurred in primary porcine EC isolated from either WT or *Gal*^{-/-} pigs. To this aim, PAEC were transduced with AdLnk, or AdGFP as a control, for 24h and then subjected to TNF stimulation for 6h. Cells were finally analysed for VCAM-1 expression by flow cytometry. The effective transduction was assessed by GFP expression (**Figure 4A**) and GFP was used to select transduced cells for analysis. When VCAM-1 expression caused by TNF was compared on controls and Lnk expressing PAEC, we found that transduction of human Lnk in pig EC significantly prevents the induction of VCAM-1 expression (**Figure 4B**). A quantitative analysis from independent experiments indicates that Lnk transgene decreases VCAM-1 induction in *Gal*^{-/-} EC up to 47% as compared to controls (3 ± 0.22 VCAM-1 fold increase for NI *versus* 1.6 ± 0.2 VCAM-1 fold increase for AdLnk, ** $p < 0.01$, $n=6$). In contrast, AdGFP has no significant effect as compared to controls (2.8 ± 0.17 VCAM-1 fold increase for AdGFP). Similar results were obtained for WT and *Gal*^{-/-} PAEC (data not shown). Thus, these findings suggest that expression of human Lnk efficiently inhibits TNF signaling in pig EC and could therefore negatively regulate an inflammatory process in xenotransplantation.

Lnk expression rescues porcine EC from TNF-mediated apoptosis and anoikis.

To functionally assess the protective effect of Lnk expression toward EC apoptosis, PAEC were treated with TNF in presence of actinomycin D (ActD), an inhibitor of RNA synthesis. As previously described, TNF promotes apoptosis in ActD presensitized PAEC (21) (20). Caspase-3 like activity was monitored in live ECs by video-microscopy using a cell permeable substrate (PhiPhiLux[®]) to detect real-time activation of caspase-3 and -7 (**Figure 5**). The PhiPhiLux probe, incorporated into cells, becomes fluorescent (red) when cleaved by activated caspases. At 24h post-infection, EC were treated with ActD/TNF and subjected to time-lapse imaging for 22h. Caspase-3/7 positive cells/field were counted every 2h during the experiment. As illustrated in (**Figure 5A**), caspase-3/7 activity is detected 10h following ActD/TNF treatment and increases linearly to reach maximum after 22h. The number of caspase-3/7 positive cells is limited in Lnk overexpressing cells compared to controls (NI, AdGFP) from 14h to 22h, with 138 ± 2.9 in NI *versus* 108 ± 3.1 positive cells in AdLnk 18h post-treatment ($n=3$). Thus, AdLnk was associated with a decreased percentage of caspase-

3/7-dependent apoptosis (21.7%) as compared to NI and AdGFP controls 18h after ActD/TNF incubation (**Figure 5B**).

Upon detachment from the extracellular matrix (ECM), EC enter into programmed cell death, a phenomenon known as anoikis. To further characterize the anti-apoptotic effect of Lnk, we tested the impact of Lnk expression on death by anoikis in PAEC. Porcine EC were transduced and subsequently detached from ECM and maintained in suspension for 18h. DNA content analyses were performed by flow cytometry. The percentage of apoptotic cells (sub-G0/G1 population) was significantly decreased in cells overexpressing Lnk compared to controls (**figure 5D**). Accordingly, Lnk reduces anoikis apoptosis by $25 \pm 1.4\%$ (** $p < 0.01$, $n=6$). All together, our data demonstrate that ectopic expression of the signaling adaptor Lnk efficiently protects porcine EC from apoptosis induced by TNF and anoikis.

Discussion

Lnk (SH2-B3) belongs with the closely related proteins APS and SH2-B to a subfamily of SH2-containing proteins with potential adaptor functions (11) (22) (23). These adaptor proteins are regulators of growth factor and cytokine receptor-mediated pathways (24). Lnk protein contains an NH₂-terminal proline rich region, a pleckstrin homology (PH) domain, a Src homology 2 (SH2) domain, and potential tyrosine phosphorylation sites. *Lnk*^{-/-} mice display an abnormal accumulation of erythroid cells, megakaryocytes, and B lymphocytes in the different hematopoietic compartments, indicating a defect in lymphoid and myeloid homeostasis (25). Lnk negatively regulates stem-cell factors c-Kit and SCF signaling in B cell precursors, hematopoietic progenitor cells and mast cells (13) (12) (26) (27). *Lnk* deficiency causes the increased signaling through cytokine receptors that are critical for growth of HSCs/HPCs such as c-Kit and thrombopoietin receptor, c-mpl (13) (28) (29) (30).

We previously reported that the adaptor Lnk is expressed in EC and that the proinflammatory cytokine TNF rapidly phosphorylates and subsequently upregulates Lnk in vascular ECs (15) (16). Our previous findings also demonstrated that activation of Lnk downregulates cellular adhesion molecules (E-Selectin and VCAM-1) expression in activated vascular ECs via a negative control on TNF signaling pathway involving both the PI3K and the ERK1/2 MAPK (16).

In this study, we have established that *Lnk* can be considered as a cytoprotective gene in the endothelium according to previous definition (31), ie, a gene that is upregulated in response to inflammatory stimuli such as TNF and acts to protect EC from apoptosis and to limit the damage associated with activation. We demonstrate that expression of human Lnk can be easily achieved in primary EC from normal or genetically engineered pig for xenotransplantation using an adenoviral vector. We confirm that adenoviral-mediated expression of Lnk in pig EC acts as a potent inhibitor of EC activation by reducing at the cell surface, level of adhesion molecules implicated in the acquisition of the EC of a proinflammatory phenotype. This result is of importance as it shows that effective protection of vascular EC could be efficiently achieved, at least in EC, independently of a classical inhibition of NFκB. However, the mechanism that account for this protection still remains to be elucidated. Moreover, we found that Lnk overexpression induces protection from TNF-mediated apoptosis and anoikis. Although different, both processes could prevent death of graft cells and restrict related inflammation. It is to notice that Lnk expression does not affect

XNA binding and complement-mediated lysis. This observation supports that Lnk transgene does not induce emergence, at least *in vitro*, of new antigenic targets for XNA binding that could be deleterious for xenograft survival.

From a therapeutic point of view, blockade of NF κ B has been initially suggested as a possible approach to prevent EC activation and inflammation in xenografts. NF κ B is a transcription factor that regulates the expression of an exceptionally large number of genes in response to infection, inflammation and other stressful situations requiring rapid reprogramming of gene expression (32). However, inhibition of NF κ B activity prevents the expression of several anti-apoptotic genes such as bcl2, A1, A20, IAP, MnSOD and thus sensitizes most cell types including EC, to undergo TNF-mediated apoptosis (33). Overexpression of NF κ B-dependent anti-apoptotic molecules such as bcl2 or A20 had proven to efficiently protect EC from injury *in vitro* and *in vivo* (20).

Some anti-apoptotic, “protective” genes are expressed by EC independently of NF κ B. These include heme oxygenase-1 (HO-1) that plays a central role in vascular inflammatory signaling reactions and mediates a protective response in several inflammatory diseases, including atherosclerosis, acute renal failure, vascular restenosis, transplant rejection, and sepsis (reviewed in (34)). HO-1, a 32-kDa enzyme, is the rate-limiting step in the degradation of heme, yielding biliverdin, carbon monoxide, and iron. HO-1 has previously been shown to be regulated by activation of the MAPK signaling cascades. The anti-apoptotic effect of HO-1 requires the activation of both the NF κ B and p38 MAPK signal transduction pathways (35). Together, these data suggest that new regulatory mechanisms and protective molecule could emerge from the elucidation of signaling associated with inflammation and apoptosis in EC.

To conclude, identification and characterization of molecular target (substrate) able to provide a negative feedback regulation of (NF- κ B) signalling in response to inflammatory stimuli in EC without sensitizing cells to apoptosis is a holy grail in autoimmunity and inflammatory diseases as well as in xenotransplantation. We suggest that Lnk may be a key adaptor for modulating signalling pathways and provide cytoprotection to vascular EC.

References

1. Sachs DH. The pig as a potential xenograft donor. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1994 Oct;43(1-3):185-191.
2. Cozzi E, White DJ. The generation of transgenic pigs as potential organ donors for humans. *Nat. Med.* 1995 Sep;1(9):964-966.
3. Phelps CJ, Koike C, Vaught TD, Boone J, Wells KD, Chen S, et al. Production of alpha 1,3-galactosyltransferase-deficient pigs. *Science.* 2003 Jan 17;299(5605):411-414.
4. Zhong R, Luo Y, Yang H, Garcia B, Ghanekar A, Luke P, et al. Improvement in human decay accelerating factor transgenic porcine kidney xenograft rejection with intravenous administration of gas914, a polymeric form of alphaGAL. *Transplantation.* 2003 Jan 15;75(1):10-19.
5. Kuwaki K, Tseng Y, Dor FJMF, Shimizu A, Houser SL, Sanderson TM, et al. Heart transplantation in baboons using alpha1,3-galactosyltransferase gene-knockout pigs as donors: initial experience. *Nat. Med.* 2005 Jan;11(1):29-31.
6. Gollackner B, Qawi I, Daniel S, Kaczmarek E, Cooper DKC, Robson SC. Potential target molecules on pig kidneys recognized by naïve and elicited baboon antibodies. *Xenotransplantation.* 2004 Jul;11(4):380-381.
7. Gollackner B, Goh SK, Qawi I, Buhler L, Knosalla C, Daniel S, et al. Acute vascular rejection of xenografts: roles of natural and elicited xenoreactive antibodies in activation of vascular endothelial cells and induction of procoagulant activity. *Transplantation.* 2004 Jun 15;77(11):1735-1741.
8. Shimizu A, Hisashi Y, Kuwaki K, Tseng Y, Dor FJMF, Houser SL, et al. Thrombotic microangiopathy associated with humoral rejection of cardiac xenografts from alpha1,3-galactosyltransferase gene-knockout pigs in baboons. *Am. J. Pathol.* 2008 Jun;172(6):1471-1481.
9. Holzknecht ZE, Kuypers KL, Plummer TB, Williams J, Bustos M, Gores GJ, et al. Apoptosis and cellular activation in the pathogenesis of acute vascular rejection. *Circ. Res.* 2002 Dec 13;91(12):1135-1141.
10. Ballermann BJ. Endothelial cell activation. *Kidney Int.* 1998 Jun;53(6):1810-1826.
11. Huang X, Li Y, Tanaka K, Moore KG, Hayashi JI. Cloning and characterization of Lnk, a signal transduction protein that links T-cell receptor activation signal to phospholipase C gamma 1, Grb2, and phosphatidylinositol 3-kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1995 Dec 5;92(25):11618-11622.
12. Takaki S, Sauer K, Iritani BM, Chien S, Ebihara Y, Tsuji K, et al. Control of B cell production by the adaptor protein lnk. Definition Of a conserved family of signal-modulating proteins. *Immunity.* 2000 Nov;13(5):599-609.
13. Velazquez L, Cheng AM, Fleming HE, Furlonger C, Vesely S, Bernstein A, et al. Cytokine signaling and hematopoietic homeostasis are disrupted in Lnk-deficient mice. *J. Exp. Med.* 2002 Jun 17;195(12):1599-1611.
14. Kubo-Akashi C, Iseki M, Kwon S, Takizawa H, Takatsu K, Takaki S. Roles of a conserved family of adaptor proteins, Lnk, SH2-B, and APS, for mast cell development, growth, and functions: APS-deficiency causes augmented degranulation and reduced actin assembly. *Biochem. Biophys.*

Res. Commun. 2004 Mar 5;315(2):356-362.

15. Boulday G, Coulon F, Fraser CC, Soullillou J, Charreau B. Transcriptional up-regulation of the signaling regulatory protein LNK in activated endothelial cells. *Transplantation*. 2002 Nov 15;74(9):1352-1354.
16. 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. *J. Biol. Chem.* 2006 Jul 21;281(29):20148-20159.
17. Lai L, Kolber-Simonds D, Park K, Cheong H, Greenstein JL, Im G, et al. Production of alpha-1,3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning. *Science*. 2002 Fév 8;295(5557):1089-1092.
18. Sachs DH, Galli C. Genetic manipulation in pigs. *Curr Opin Organ Transplant*. 2009 Avr;14(2):148-153.
19. Brunetti D, Perota A, Lagutina I, Colleoni S, Duchi R, Calabrese F, et al. Transgene expression of green fluorescent protein and germ line transmission in cloned pigs derived from in vitro transfected adult fibroblasts. *Cloning Stem Cells*. 2008 Déc;10(4):409-419.
20. Ferran C, Stroka DM, Badrichani AZ, Cooper JT, Wrighton CJ, Soares M, et al. A20 inhibits NF-kappaB activation in endothelial cells without sensitizing to tumor necrosis factor-mediated apoptosis. *Blood*. 1998 Avr 1;91(7):2249-2258.
21. Karsan A, Yee E, Harlan JM. Endothelial cell death induced by tumor necrosis factor-alpha is inhibited by the Bcl-2 family member, A1. *J. Biol. Chem.* 1996 Nov 1;271(44):27201-27204.
22. Takaki S, Watts JD, Forbush KA, Nguyen NT, Hayashi J, Alberola-Ila J, et al. Characterization of Lnk. An adaptor protein expressed in lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 1997 Jun 6;272(23):14562-14570.
23. Yokouchi M, Suzuki R, Masuhara M, Komiya S, Inoue A, Yoshimura A. Cloning and characterization of APS, an adaptor molecule containing PH and SH2 domains that is tyrosine phosphorylated upon B-cell receptor stimulation. *Oncogene*. 1997 Jul 3;15(1):7-15.
24. Takizawa H, Eto K, Yoshikawa A, Nakauchi H, Takatsu K, Takaki S. Growth and maturation of megakaryocytes is regulated by Lnk/Sh2b3 adaptor protein through crosstalk between cytokine- and integrin-mediated signals. *Exp. Hematol.* 2008 Jul;36(7):897-906.
25. Simon C, Dondi E, Chaix A, de Sepulveda P, Kubiseski TJ, Varin-Blank N, et al. Lnk adaptor protein down-regulates specific Kit-induced signaling pathways in primary mast cells. *Blood*. 2008 Nov 15;112(10):4039-4047.
26. Takaki S, Tezuka Y, Sauer K, Kubo C, Kwon S, Armstead E, et al. Impaired lymphopoiesis and altered B cell subpopulations in mice overexpressing Lnk adaptor protein. *J. Immunol.* 2003 Jan 15;170(2):703-710.
27. Seita J, Ema H, Oechara J, Yamazaki S, Tadokoro Y, Yamasaki A, et al. Lnk negatively regulates self-renewal of hematopoietic stem cells by modifying thrombopoietin-mediated signal transduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2007 Fév 13;104(7):2349-2354.
28. Tong W, Lodish HF. Lnk inhibits Tpo-mpl signaling and Tpo-mediated megakaryocytopoiesis. *J. Exp. Med.* 2004 Sep 6;200(5):569-580.

29. Tong W, Zhang J, Lodish HF. Lnk inhibits erythropoiesis and Epo-dependent JAK2 activation and downstream signaling pathways. *Blood*. 2005 Jun 15;105(12):4604-4612.
30. Takizawa H, Kubo-Akashi C, Nobuhisa I, Kwon S, Iseki M, Taga T, et al. Enhanced engraftment of hematopoietic stem/progenitor cells by the transient inhibition of an adaptor protein, Lnk. *Blood*. 2006 Apr 1;107(7):2968-2975.
31. Bach FH, Hancock WW, Ferran C. Protective genes expressed in endothelial cells: a regulatory response to injury. *Immunol. Today*. 1997 Oct;18(10):483-486.
32. Ghosh S, Hayden MS. New regulators of NF-kappaB in inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 2008 Nov;8(11):837-848.
33. Beg AA, Baltimore D. An essential role for NF-kappaB in preventing TNF-alpha-induced cell death. *Science*. 1996 Nov 1;274(5288):782-784.
34. Abraham NG, Kappas A. Heme oxygenase and the cardiovascular-renal system. *Free Radic. Biol. Med.* 2005 Jul 1;39(1):1-25.
35. Soares MP, Usheva A, Brouard S, Berberat PO, Gunther L, Tobiasch E, et al. Modulation of endothelial cell apoptosis by heme oxygenase-1-derived carbon monoxide. *Antioxid. Redox Signal.* 2002 Apr;4(2):321-329.

Abbreviations

ActD: actinomycin D, Ad: recombinant adenovirus, AHXR: acute humoral vascular xenograft rejection, C: complement, CDC: complement-dependent cytotoxicity, ECM: extracellular matrix, HAR, Hyperacute rejection, EC: endothelial cells, α Gal: galactose-alpha1,3-galactose, GFP: green fluorescent protein, KO: knock out, MOI: multiplicity of infection, PAEC: porcine aortic endothelial cells, TF: tissue factor, TNF: Tumor necrosis factor, VCAM-1: vascular cell adhesion molecule-1, WT: wild type, XNA: xenogeneic natural antibodies.

Acknowledgements

The authors thank Professor David Sachs for providing *Gal*^{-/-} fibroblasts. We thank the vector core of the University Hospital of Nantes supported by the Association Française contre les Myopathies (AFM) for providing the adenoviral vectors.

The authors thank Philippe Hulin and the “confocal microscopy and cellular imaging platform” of IFR26 for time lapse study, Irina Lagutina, Roberto Duchi, Dario Brunetti for generating the pig by SCNT. This work was supported by “Xenome”, a European Commission-funded Integrated Project, Life Sciences, Genomics and Biotechnology for Health LSHB-CT-2006-037377, by “Plurysis” (EU project n. 223485) and by fellowships from L’Agence de Biomédecine and La Fondation de l’Avenir (ET08-048). J.D. was supported by a fellowship from la Région Pays de la Loire.

Figure legends

Figure 1. Characterization of endothelial cultures from wild type and *Gal*^{-/-} pigs and basal and regulated expression of endogenous Lnk.

(A) Phenotype of PAEC isolated from WT or *Gal*^{-/-} pigs. A representative FACS analysis out of 3 independent experiments showing CD31 and Gal expression on PAEC. Gal expression was determined using FITC-labeled isolectin B₄ (BSI) and CD31 using specific anti-pig antibody. Control using secondary antibody alone is represented in dotted line. Data are presented as histograms plotting median fluorescence intensity on a logarithmic scale (x axis) versus % of maximum (y axis). (B) A representative FACS analysis comparing pig Lnk endogenous expression in WT and *Gal*^{-/-} PAEC. Intracellular staining for Lnk was performed on fixed cells using an anti-human Lnk antibody cross-reacting with its porcine counterpart. Median fluorescence intensities are indicated. (C) A representative analysis of Lnk expression upon EC activation examined by Western blotting on WT PAEC. Confluent EC monolayers were incubated with human TNF (800 UI/mL) for the indicated periods. Cells were lysed to allow protein analysis. Blots were reprobated with anti-GAPDH antibodies to ensure equal loading.

Figure 2. Adenovirus-mediated gene transfer of human Lnk in pig EC.

(A) Dose-response of GFP/Lnk expression according to the MOI examined 24h post-infection. Results of FACS analysis are expressed as percentages of GFP positive cells ± SEM (B) A representative Western blot analysis showing the time course of Lnk expression in cultured PAEC post-infection. Blots were reprobated with an anti-GAPDH antibody to ensure equal loading. (C) A FACS analysis comparing Lnk transgene expression in WT and *Gal*^{-/-} PAEC. Cells were non infected (NI) or transduced with either control AdGFP or AdLnk. Intracellular staining for Lnk was performed on fixed cells 24h post infection with specific anti-Lnk antibody. Median fluorescence intensities are indicated.

Figure 3. Lnk does not affect cytotoxicity mediated by human anti-pig XNA and complement.

(A) A representative complement-dependent cytotoxicity analysis comparing WT PAEC and *Gal*^{-/-} PAEC lysis (n=3, ***p<0.001). (B, C) Cells were non infected (NI) or transduced with either control AdGFP or AdLnk. (B) A representative complement-dependent cytotoxicity analysis out of 5 independent experiments. CDC was performed 24h post-infection on WT

PAEC incubated with normal human sera (dilution 1:8) and rabbit complement (dilution 1:6) for 40min at 37°C. Controls were performed by omitting human sera. After treatment, cytotoxicity was measured by flow cytometry using C5b-9 staining. Results are expressed as percentage of C5b-9 positive cells lysis. (C) A quantitative analysis from 3 independent experiments showing human immunoglobulins binding (IgG and IgM) from a pool of human sera on PAEC. Results are expressed as median fluorescence intensity (MFI).

Figure 4. Lnk expression in PAEC inhibits VCAM-1 induction in response to human TNF.

(A) A representative dot plot analysis showing double staining for VCAM-1 (FL4) and GFP (FL1) in AdLnk transduced *Gal^{-/-}* PAEC. Percentage of GFP positive cells is indicated. (B) VCAM-1 expression in cells non infected (NI) or transduced with the AdGFP or AdLnk for 24h and stimulated or not with TNF for 6h. Data are presented as histograms plotting median fluorescence intensity *versus* % of maximum (C) A quantitative analysis of VCAM-1 expression, measured by flow cytometer, from 6 independent experiments. Results are expressed as VCAM-1 fold increase \pm SEM between VCAM-1 level of non stimulated cells and VCAM-1 level of cells treated with TNF. (**p<0.05 *versus* GFP control)

Figure 5. Lnk protects actinomycin D-sensitized PAEC from TNF-mediated apoptosis and anoikis.

PAEC were non infected (NI) or transduced with either control AdGFP or AdLnk. (A) A representative analysis of 3 independent experiments showing caspase-3/7 activity in cells treated with ActD/TNF. Caspase-3/7 positive cells/field were counted every 2h during the experiment. Controls used are medium and Actinomycin D alone (not shown). The activity of caspase-3/7 is monitored by videomicroscopy with the Phiphilux reagent (dilution 1:10). (B) A quantitative analysis of 3 independent experiments showing number of caspase-3/7 positive cells treated with ActD/TNF-induced cytotoxicity for 18h (**p<0.005). (C) A representative illustration after imaging 18h (objective X10). Overlay of phase and caspase-3/7 activity (red) is represented. White arrows underline typical caspase-3/7 positives cells staining. (D) A quantitative anoikis assay out of 5 independent experiments. 24h post-infection, PAEC were plated in 12-well plate pre-coated with polyHEMA for 18h. DNA content analyses were performed by flow cytometry using propidium iodide staining. Histograms represent percentage of apoptotic cells. (**p<0.05 *versus* GFP control).

Figure 1

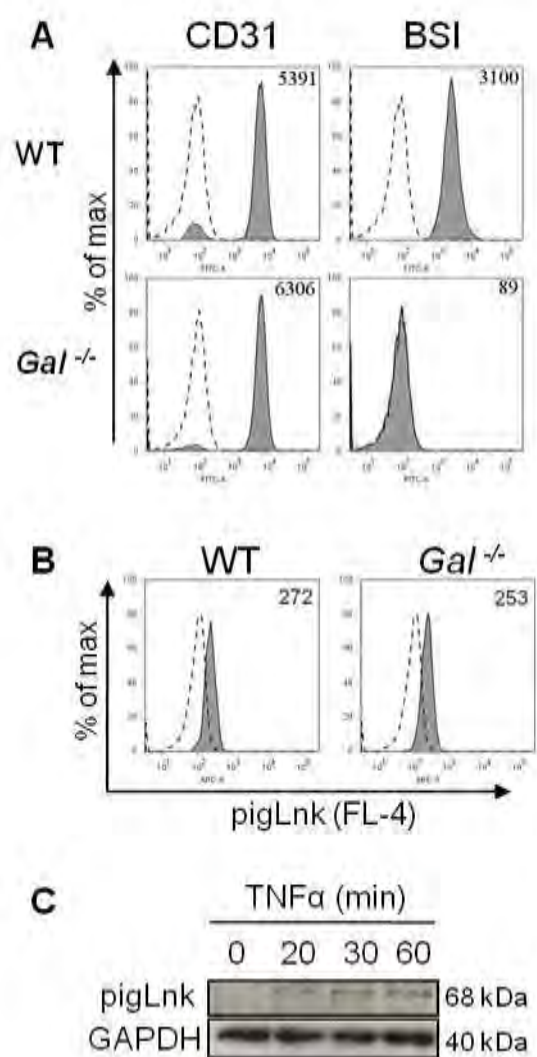


Figure 2

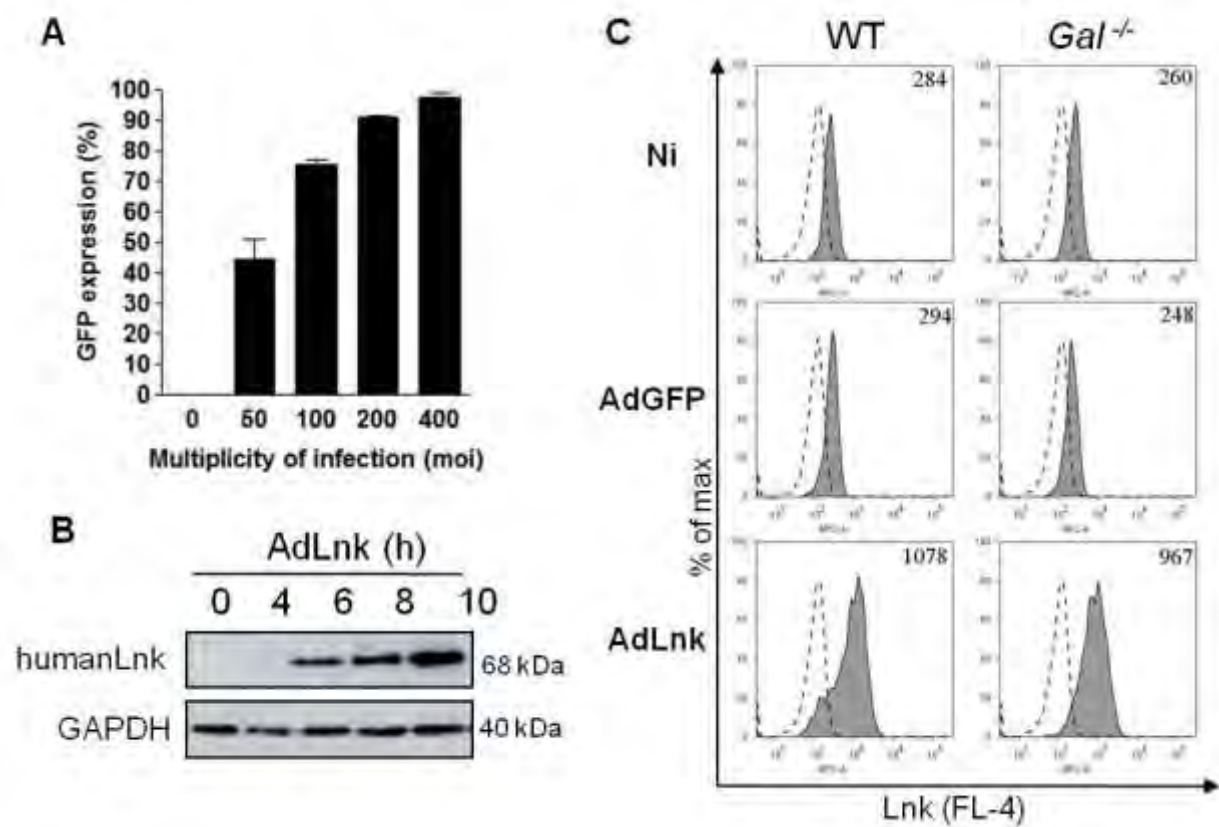


Figure 3

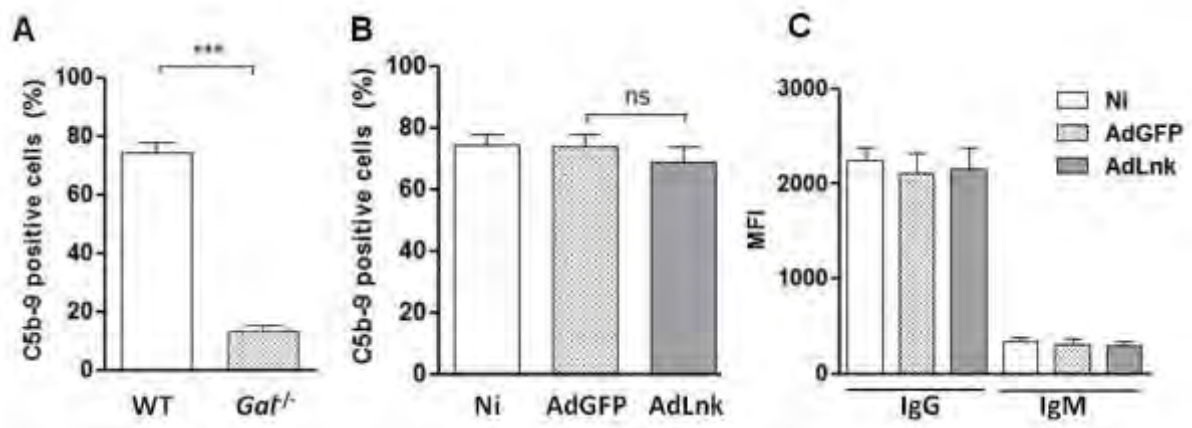


Figure 4

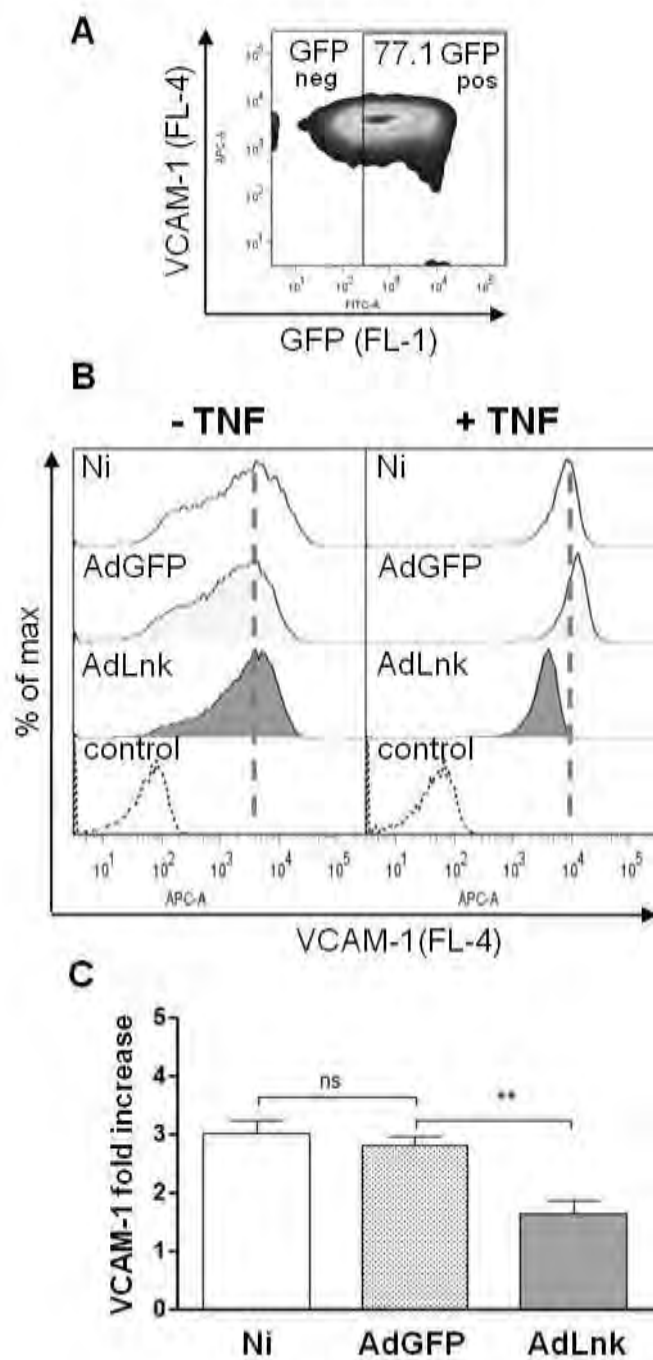
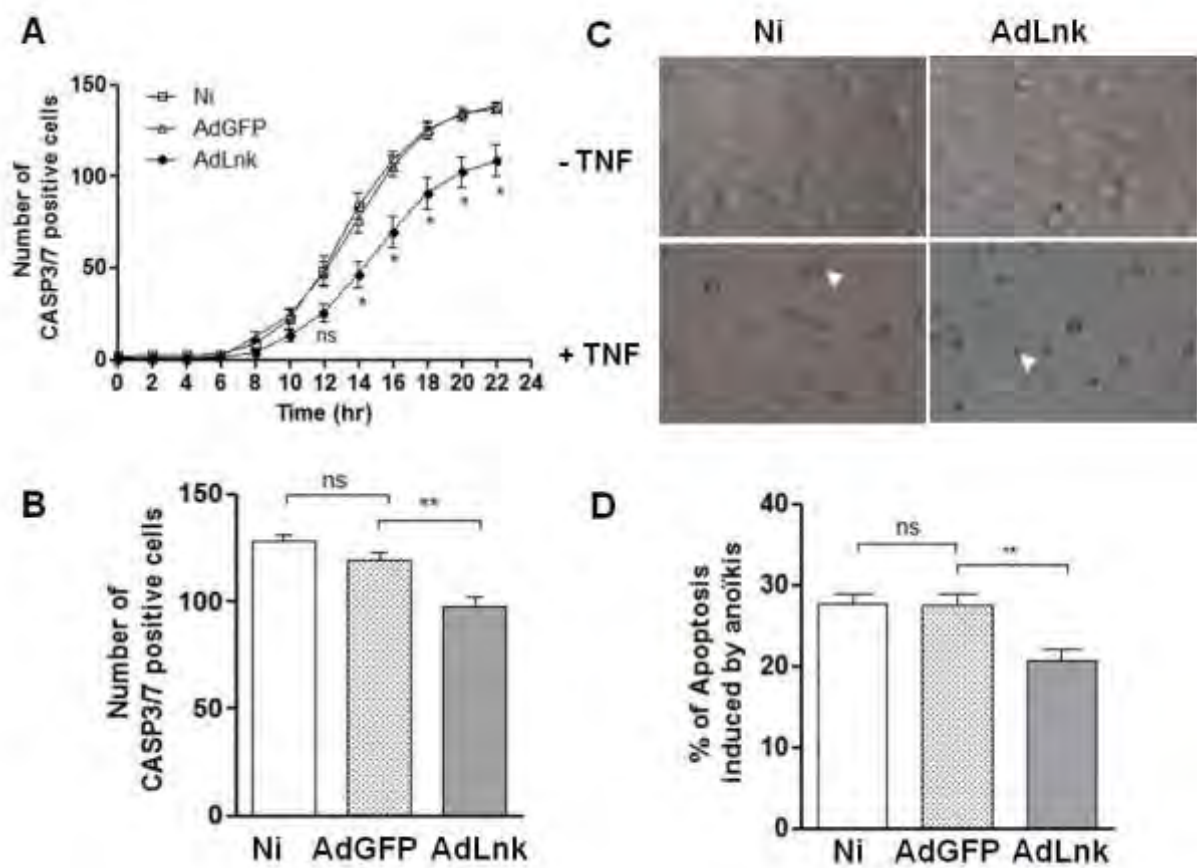


Figure 5



Partie III : Importance de la voie Notch dans la dysfonction endothéliale en transplantation : Régulation et fonctions des récepteurs Notch2 et Notch4

Chez les mammifères, la famille de Notch se compose de quatre récepteurs Notch, (Notch1-4) et de cinq ligands dont trois Delta-like (Dll1, Dll3, Dll4) et deux Jagged (Jagged1 et Jagged2). Les récepteurs et ligands de cette voie sont exprimés dans les CE comme dans les cellules musculaires lisses (CML). Notch1 et Notch4 sont exprimés dans les CE alors que Notch3 semble être préférentiellement présent à la surface des CML. Notch2 est quant à lui détecté dans ces deux types de cellules vasculaires (Iso et al., 2003a).

Les ligands de la voie Notch sont également présents dans les CE comme dans les CML. Des niveaux variables de Jagged2 (Jag2) ont été décrits dans l'endothélium, au contraire du ligand Dll3 qui n'a pas été détecté au niveau vasculaire (Tsai et al., 2000) (Lindner et al., 2001). Toutefois, l'expression des ligands de Notch est très dynamique et soumise à des régulations complexes, aussi bien temporelles que spatiales (Hofmann et Luisa Iruela-Arispe, 2007).

Le récepteur Notch est synthétisé sous forme d'un précurseur de 300kDa, qui est clivé constitutivement dans le système trans de l'appareil de Golgi par une furine (S1) (Figure 28). Ce clivage conduit à la formation de deux sous-unités : le fragment extracellulaire (NECD) et le fragment transmembranaire (NTM) composé du domaine transmembranaire et du domaine intracellulaire (NICD). Les fragments NECD et NTM sont associés de façon non-covalente et calcium-dépendante sous forme d'hétérodimère (Logeat et al., 1998) et adressés à la surface cellulaire. Ils restent ainsi inactifs jusqu'à leur liaison avec un de leurs ligands présents à la surface d'une cellule contiguë. L'interaction avec le ligand provoque des changements conformationnels du récepteur qui permettent son clivage (S2) par des métalloprotéases (ADAM10, ADAM17) puis par un complexe γ -sécrétase (S3) composé de préséniline, nicastrine, PEN2 et APH1 (Fortini, 2002). Le NICD est ainsi libéré dans le cytoplasme et acheminé dans le noyau où il interagit avec CSL (CBF1, Su(H) et Lag-1). La famille CSL regroupe des protéines liant l'ADN, qui en l'absence de NICD participent à un complexe inhibiteur qui bloque la transcription (Kao et al., 1998). L'activation de la voie

Notch, par la libération et la fixation du NICD sur CSL permet de lever l'inhibition par le désassemblage du complexe represseur et le recrutement de nouvelles protéines, conduisant à la transcription des gènes-cibles de la voie (Figure 28).

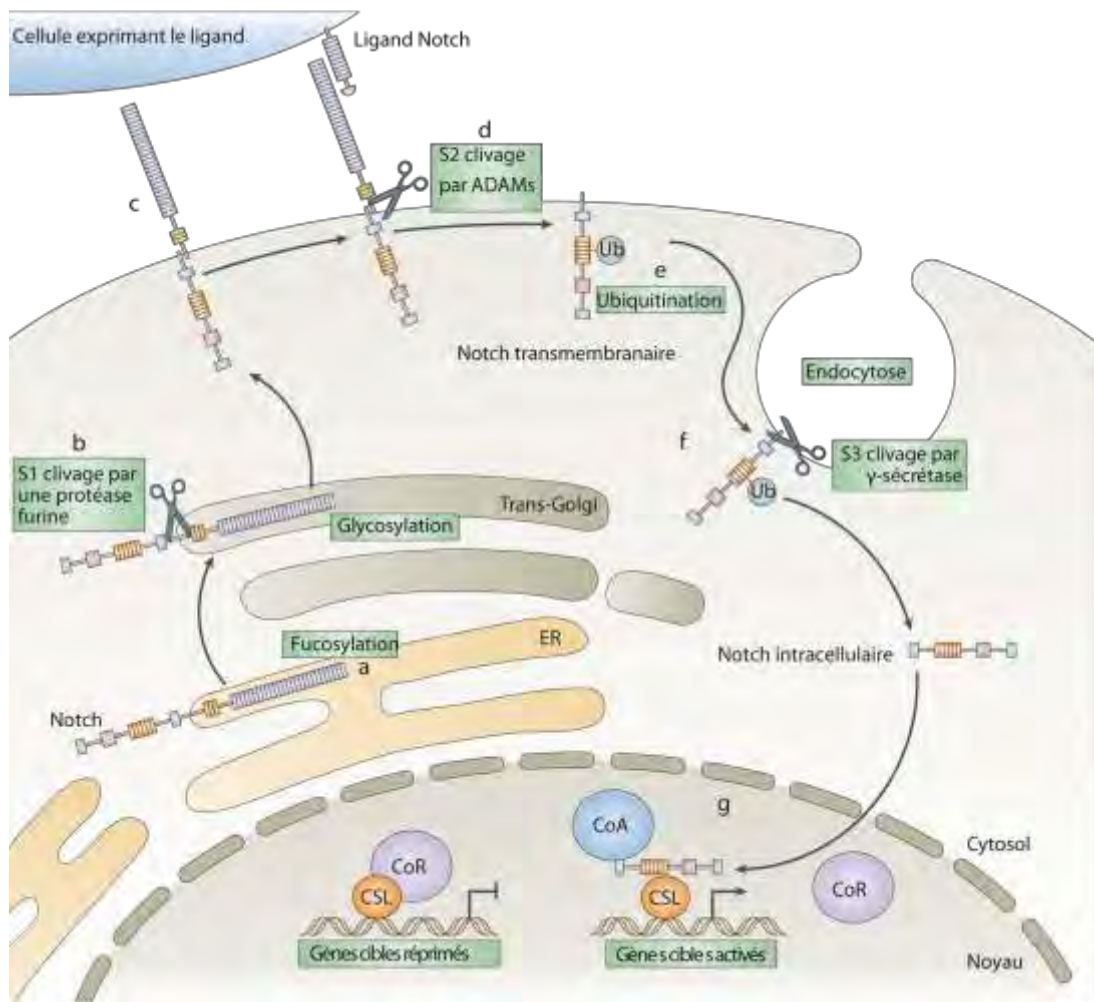


Figure 28. Expression et activation de la voie de signalisation Notch. Les différentes étapes présentent la fucosylation (a) suivie du clivage par la furine (b) et l'expression à la membrane de l'hétérodimère Notch (c). Son activation par la liaison avec un de ses ligands, induit le clivage par les métalloprotéases ADAM (d) l'ubiquitination (e) et la libération de Notch intracellulaire (f). Notch se déplace jusqu'au noyau et s'associe avec CSL, induisant l'expression des gènes cibles régulés par CSL (g). CoA, co-activateur ; CoR, co-répresseur.

D'après (Osborne et Minter, 2007)

Les principaux gènes cibles décrits à ce jour sont les facteurs de transcription de la famille Hes (*Hairy/Enhancer of Split*) et Hey (*Hairy/Enhancer of Split related with YRPW*). Ces molécules codent pour des protéines de type bHLH (*basic helix-loop-helix*) et constituent à eux-seuls une famille de répresseurs de transcription dont les spécificités et les

combinaisons complexes suggèrent une régulation fine de nombreux gènes-cibles (Iso et al., 2003b).

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 feuillettes primaires (ex pancréas, appareil vasculaire, système nerveux) (Lammert et al., 2000) (Karsan, 2005) (Yoon et Gaiano, 2005). Mais la voie de Notch participe également au contrôle de la prolifération et l'apoptose de nombreux types cellulaires, faisant l'objet de multiples études dans le cadre de l'oncogenèse (Leong et Karsan, 2006). Enfin, des travaux importants et récents rapportent les fonctions vasculaires de la voie Notch. 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 lors de l'angiogenèse tumorale (Leong et al., 2002) (MacKenzie et al., 2004) (Hellström et al., 2007) (Suchting et al., 2007).

Dans cette troisième partie, nous avons entrepris de caractériser l'implication de la voie Notch dans l'activation et la dysfonction endothéliale qui participent à la présentation des antigènes du greffon, à la réponse anti-greffon ainsi qu'au développement de l'artériosclérose. Nous avons tout d'abord analysé l'expression et les régulations des molécules Notch dans les CE en réponse aux cytokines inflammatoires. Nous avons observé qu'en réponse aux cytokines comme le TNF α , les CE présentent une profonde modification du phénotype Notch. Ces résultats font l'objet d'un article publié dans *Biochemical Pharmacology* en 2010. Nous avons poursuivi ce travail par l'étude fonctionnelle de l'augmentation d'expression et d'activité de Notch2 dans la dysfonction endothéliale, présentée dans un article publié dans *PLoS ONE* en 2009.

Article 3 : L'inflammation induit la modification du phénotype Notch dans les CE : implication de Notch2 et Notch4 dans la dysfonction endothéliale

Résumé de l'article :

L'activation endothéliale induite par l'inflammation entraîne une modification de phénotype et des 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 ce contexte, nous avons étudié l'implication de la voie Notch dans l'inflammation vasculaire.

Nous avons montré que les cytokines pro-inflammatoires conduisent à une régulation spécifique de la voie de signalisation de Notch dans les CE. Plus particulièrement, nous avons observé que le récepteur spécifique de l'endothélium Notch4 est fortement sous-exprimé dans les CE activées par le TNF α alors qu'à l'inverse, le récepteur Notch2 est fortement surexprimé. Ces modifications différentielles sont associées à une diminution de l'expression des facteurs de transcription hes1 et de hey2 sous le contrôle des récepteurs Notch, suggérant que le TNF α régule à la fois l'expression et l'activité de Notch. De plus, par l'utilisation d'inhibiteurs chimiques, nous avons démontré que le contrôle de Notch2 et Notch4 se fait indépendamment par des voies de signalisation différentes, il est ainsi médié par NF κ B pour Notch2 et par la PI3K pour Notch4. D'un point de vue fonctionnel, la régulation de Notch par le TNF α provoque l'apoptose des cellules endothéliales. En effet, la diminution de l'expression de Notch4 par des siRNA ou l'augmentation de celle de Notch2 par la transduction d'un adénovirus, favorise l'apoptose avec une activation des caspases 3 et 7. Afin d'estimer la relevance biologique de ces données in vitro, nous avons analysé l'expression de Notch2 et 4 dans des CE issues de poumons de rats ayant subi une injection de TNF α . Nous avons ainsi montré une régulation similaire des récepteurs in vivo, qui s'accompagne d'une induction de l'apoptose des CE.

Ces résultats montrent l'importance des médiateurs solubles de l'inflammation dans la régulation de la voie Notch et l'implication de cette voie dans la dysfonction endothéliale.



Contents lists available at ScienceDirect

Biochemical Pharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/biochempharm



Inflammation dysregulates Notch signaling in endothelial cells: Implication of Notch2 and Notch4 to endothelial dysfunction

Thibaut Quillard^{a,b,c,1}, Julie Devallière^{a,b,c}, Stéphanie Coupel^{a,b,c}, Béatrice Charreau^{a,b,c,*}

^aINSERM, U643, Nantes F44000, France

^bCHU Nantes, Institut de Transplantation et de Recherche en Transplantation, ITERT, Nantes F44000, France

^cUniversité de Nantes, Faculté de Médecine, Nantes F44000, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 April 2010

Accepted 8 July 2010

Available online xxx

Keywords:

Endothelium

Inflammation

Notch

Cell signaling

Apoptosis

TNF

ABSTRACT

Although the involvement of the Notch pathway in several areas of vascular biology is now clearly established, its role in vascular inflammation at the endothelial level remains to be elucidated. In this study, we demonstrated that pro-inflammatory cytokines drive a specific regulation of the Notch pathway in vascular endothelial cells (ECs). In arterial ECs, TNF α strongly modulates the pattern of Notch expression by decreasing Notch4 expression while increasing Notch2 expression. Changes in Notch expression were associated with a reduction in hes1 and hey2 expression and in CBF1 reporter gene activity, suggesting that TNF α regulates both Notch expression and activity. Notch2 and Notch4 regulations occurred independently and were found to be mostly mediated by the NF κ B signaling pathways and PI3-kinase signaling pathways, respectively. Functionally, TNF-mediated Notch regulation promotes caspase-dependent EC apoptosis. Finally, our findings confirmed that dysregulated Notch signaling also occurs upon inflammation *in vivo* and correlates with caspase activation and apoptosis. In conclusion, inflammatory cytokines elicit a switch in Notch expression characterized by Notch2 predominance over Notch4 leading to a reduced Notch activity and promoting apoptosis. Thus, here we provide evidence for a role of soluble mediators of inflammation (i.e. cytokines) in the regulation of Notch signaling and for the implication of a dysregulated Notch pathway to endothelial and vascular dysfunction.

© 2010 Published by Elsevier Inc.

1. Introduction

Notch signaling is an evolutionarily conserved pathway that allows cell communication through molecular cell/cell interactions [1]. Notch encodes a single pass transmembrane protein with epidermal growth factor (EGF) repeats in the extracellular domain and ankyrin repeats in the intracellular domain that can binds to two different ligands, Delta and Serrate/Jagged. Vertebrates express multiple Notch receptors (Notch1 to 4) and ligands including Delta-like (Dll) 1, 3 and 4, and Jagged 1 and 2. The Notch receptors undergo three successive cleavages before allowing transcription of downstream targets. The first proteolytic event occurs in the trans-Golgi network by a furin-like convertase and

leads to the cell surface presentation of a functional heterodimeric form of the receptors. The second cleavage, mediated by a disintegrin and metalloprotease (ADAM) family member, occurred after interaction with a ligand expressed on neighboring cells. Finally, the γ -secretase complex allows the cytoplasmic release of the intracellular domain of the receptor. This fragment is then translocated into the nucleus where it binds to the mammalian transcription factor CBF1/RBP-J κ docked in a transcriptional repressor complex. This interaction ultimately leads, through displacing the silencing complex and by the recruitment of coactivator factors, to the expression of primary target genes such as the hes and herp/hey genes [2]. Many studies have reported that the Notch pathway plays a fundamental role in drosophila and mammal development [1]. More recently, it was shown that Notch also plays major roles in the adult in several contexts involving cell plasticity, such as proliferation, oncogenesis [3], immune recognition [4], and angiogenesis [5].

Endothelial cells (ECs) control vascular tone, leukocyte adhesion, coagulation and thrombosis by a fine-tuned regulation of many cell surface and soluble molecules [6]. EC activation is considered to be an early event which subsequently leads to EC dysfunction and ultimately to vascular injury, key events

Abbreviations: ECs, endothelial cells; HAECs, human arterial ECs; HUVECs, human umbilical vein ECs; ICD, intracellular domain; SMCs, smooth muscle cells.

* Corresponding author at: INSERM U643, ITERT, CHU Hôtel-Dieu, 30 Bd Jean Monnet, F-44093 Nantes, France. Tel.: +33 240 087 416; fax: +33 240 087 411.

E-mail addresses: Beatrice.Charreau@univ-nantes.fr, brlcharreau@gmail.com (B. Charreau).

¹ Present address: Cardiovascular Medicine, Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, Boston, MA, USA.

0006-2952/\$ – see front matter © 2010 Published by Elsevier Inc.
doi:10.1016/j.bcp.2010.07.010

Please cite this article in press as: Quillard T, et al. Inflammation dysregulates Notch signaling in endothelial cells: Implication of Notch2 and Notch4 to endothelial dysfunction. *Biochem Pharmacol* (2010), doi:10.1016/j.bcp.2010.07.010

associated with acute and chronic inflammation, including sepsis, atherosclerosis and acute vascular and chronic allograft rejection [7,8]. EC changes involve membrane damage, increased permeability, swelling, apoptosis and necrosis. The EC loss of function could be as a result of changes in hemodynamic forces (shear and/or hoop stress), direct drug-induced cytotoxicity, mechanical device implant-induced injury and/or immune-mediated mechanisms [9,10]. Inflammatory signaling cascades alter EC integrity by enhancing expression of cellular adhesion molecules, activation of cytotoxic T cells and/or induction of antibodies directed against EC surface [7]. Local release of inflammatory cytokines, including TNF α and IL-1 β , and chemokines activate ECs to upregulate soluble adhesion molecules, activate neutrophils and generate reactive oxygen species that amplify the initial inflammation leading to dysregulated apoptosis, secondary necrosis and overt vascular injury lesions. Considering the role of the endothelium in the initiation and propagation of vascular wall injury, there is a need for the discovery of molecular targets to serve as inhibitors of EC activation, dysfunction and vascular injury [6].

Both embryonic and adult ECs express Notch receptors and Notch ligands [2]. Notch signaling has been extensively implicated in endothelial cell-fate determination along vasculogenesis and angiogenesis [11]. Several studies examining the effects of activated Notch signaling on EC phenotype and function have identified potential mechanisms including endothelial-to-mesenchymal (EMT) transformation [12], EC proliferation [13] and control of apoptosis [14]. Recent findings further suggest a potential role for deregulated Notch signaling in tumor angiogenesis and metastasis [15]. It has also been reported that Notch may be necessary for the establishment and/or maintenance of quiescent EC phenotype [16]. However, implication of Notch signaling in activated EC phenotype and function upon inflammation has not been documented.

In previous studies, we investigated signaling pathways regulated by TNF α in vascular ECs [17–20]. Of particular interest, we have shown that the desintegrin and metalloproteinase known as Kuzbanian or ADAM-10 is strongly upregulated at mRNA and protein level in ECs activated with TNF α [17]. ADAM-10 is involved in the processing of Notch receptors and ligands [21], suggesting a potential crosstalk between TNF signaling and Notch pathway that may contribute to changes in EC phenotype and functions. We also reported on the contribution of Notch signaling in transplant arteriosclerosis and endothelial injury [22,23]. In this study, we investigated the regulation of Notch receptors and effector molecules in human vascular ECs upon stimulation with TNF α and other pro-inflammatory mediators *in vitro* and *in vivo*. Moreover, the overall Notch activity and the respective involvement of TNF α -mediated signaling pathways, including NF κ B, PI-3 kinase and JNK MAPK, in Notch regulation was also examined.

2. Materials and methods

2.1. Cell culture and reagents

Primary cultures of human ECs issued from segments of renal artery (HAEC) or from human umbilical veins (HUVEC) were isolated and cultured as we previously reported [19]. ECs were grown in endothelial basal growth medium (ECBM, Promocell, Heidelberg, Germany) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), 0.4% EC growth supplement/heparin, 0.1 ng/mL human epidermal growth factor, 1 ng/mL human basic fibroblast growth factor, 1 μ g/mL hydrocortisone, 50 μ g/mL gentamicin, and 50 ng/mL amphotericin B (Promocell). Before activation, confluent EC monolayers were growth factor and serum depleted by culture for 24 h in basal ECBM supplemented with only 2% FCS. For activation, confluent EC monolayers were cultured with 100 U/mL recombinant human gamma interferon (IFN γ) (Imukin, Boehringer

Ingelheim, Germany) or human tumor necrosis factor-alpha (TNF α) (provided by Professor P. Neuman, BASF, BASF Ludwigshafen, Germany). Human Recombinant IL1 β (R&D Systems, Abingdon, UK) was used at 5 ng/mL. For inhibition experiments, SP600125 (10 μ M), N-acetyl-cysteine (NAC, 10 mM), pyrrolidine dithiocarbamate (PDT; 100 μ M) and wortmannin (100 nM) (all purchased from Sigma–Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) were added to cells 1 h before TNF α treatment.

2.2. Recombinant adenovirus, siRNAs, plasmids and transfection

The recombinant adenovirus for Notch2NICD and GFP (AdN2ICD) was generated as we previously described [23] and produced in the 293 cells by the vector core laboratory of the University Hospital of Nantes (INSERM UMR649 Gene Therapy Laboratory, Nantes, France). The recombinant adenovirus AdTrack-GFP was used as control (AdGFP). Adenoviral infection was carried out in ECGM supplemented with 1% FCS for 3 h at 37 °C, 5% CO₂ under agitation. 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).

For gene silencing, cells were transfected according to manufacturer's recommendations with RNAiMax lipofectamine[®] (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) and siRNA targeting Notch4 (#107458, 95% knockdown, #107459, 74% knockdown), or a scrambled negative control (#AM4611) (Ambion, Austin, TX, USA) at a final concentration of 10 nM. Specific expression knockdown by siRNA was attested by qRT-PCR and functional assays were assessed 48 h post-transfection.

2.3. Semi-quantitative RT-PCR, quantitative real-time PCR and Southern blotting

RNA was isolated using Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and treated with DNase (Ambion) before reverse transcription (RT). Subsequent to RT, cDNA were amplified by PCR and analyzed in agarose gels stained with ethidium bromide. For semi-quantitative RT-PCR, PCR conditions were optimized for each primer set and performed for 18–35 cycles of amplification to allow semi-quantitative analysis (Table 1). For Southern blotting, PCR products were purified according to the nucleospin extract II protocol (Macherey-Nagel, Hoerd, France). Purified amplicons were then cloned into the TOPO TA cloning[®] vector (Invitrogen) and sequenced before their use as cDNA probes. Southern blotting and hybridizations were performed as we previously described [17]. Quantitative PCRs were performed using the ABI PRISM 7700 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). Normalization was made with the control samples in the human cells and with an additional reference sample for the rat study. Relative expression was calculated according to the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method, as previously described [24]. Custom primers were obtained from MWG (High Point, NC, USA) and used for semi-quantitative PCR and qPCR (Table 1). Transcript levels were quantified by qRT-PCR with the following primers and probe from Applied Biosystems (Foster City, CA, USA): Notch1 (Hs00413187_m1), Notch2 (Hs00225747_m1; Rn00577522_m1), Notch4 (Hs00270200_m1; Rn01525737_g1), hey1 (Hs00232618_m1), VCAM-1 (Hs00365486_m1; Rn00563627_m1) and HPRT (Rn01527838_g1).

2.4. Immunoblotting

Cells were lysed on ice in 20 mmol/L Tris–HCl (pH 7.4), 137 mmol/L NaCl, 0.05% Triton X-100, 1 mmol/L phenylmethylsulfonyl fluoride supplemented with protease inhibitors (PIC,

Table 1
Oligonucleotide primer pairs and PCR conditions for semi-quantitative analysis.

Target	Forward (sequence 5'–3')	Reverse (sequence 5'–3')	Number of PCR cycles
Notch2	GCAGGAGGTGGATGTGTTAG	CCAGGATCAGGGGTGTAGAG	21
Notch4	TGTTTGATGGCTACGACTGT	TCCTTACCCAGAGTCTACC	27
hes1	AGAGGCGGCTAAGGTGTTTG	GAGAGGTGGGTTGGGGAGTT	25
hes2	TCATCTGCCGCTGCTGGG	TACCTGGAGCTGTGAAG	30
hes3	TCCTCTCCCGAAAGTCTC	CACGACCAGAACGGCAGACT	35
hes4	CTCAGCTCAAACCTCATC	GCGTACTTGCCAGAACGG	30
hes5	TGGGGTTGTTCTGTGTTTGC	CAGACCACCAGGCACACTCA	35
hes6	CCCTGAGGCTGAAGTGAAGT	CTACCCACCACATCTGAAC	30
hes7	TAGGGGTGGGGTAGAGACTC	AGACAGAAGGGAAGGGAAAG	35
hey1	CAGGCAACAGGGGGTAAAG	GTGGAGCGGATGATGGTGGT	27
hey2	GTCGCCTCTCCACAACITCA	CTGGACGTGGCTGATACTGA	27
hey3	TGGGACAGGATCTTTGATG	GGTAAGCAGGAGAGGAGACA	35
VCAM-1	AATGTTGCCCCAGAGATAC	TCTCTGTCTCGCTTTTTT	27
β -actin	TCTGGCACCACCTTCTAC	CAGTTCTCTTAATGTAC	18

Sigma–Aldrich). Lysates were resolved by sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (6–10%) and subjected to Western immunoblot analysis using specific antibodies against Notch2 (C651.6DbHN, Developmental Studies Hybridoma Bank, IA, USA), Notch4 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), total and cleaved caspase 3 and 7 (Cell Signaling Technology, St Quentin-en-Yveline, France) and tubulin (Oncogene, MERCK EuroLab, Val de Fontenay, France), and secondary horseradish peroxidase-labeled anti-rabbit, anti-mouse, or anti-goat antibodies (Cell Signaling Technology). Antibody-bound proteins were detected using an enhanced chemiluminescence kit (ECL kit, Amersham, Les Ulis, France).

2.5. Apoptosis assays

Measurement of caspase activity – Caspase activity was analyzed by western blot using antibodies against cleaved Caspase-3 (Asp175), cleaved Caspase-7 (Asp198), and antibodies against total caspase-3 and -7 (all from CST).

The cell-permeable fluorogenic substrate PhiPhiLux-G2D2 (OncoImmunin, Gaithersburg, MD) containing the cleavage site DEVD was used to monitor caspase-3-like activity in intact cells. ECs were incubated with the substrate solution for 1 h at 37 °C in the dark, according to the manufacturer's instructions. Caspase 3 activation/apoptosis was examined during 18 h by time lapse imaging using a microscope DMI6000B (Leica Microsystems SAS, Rueil Malmaison) equipped with an objective lens X40 (HCX FL Plan), and a CCD camera (Coolsnap HQ2, Photometrics Roper Scientifics SAS Evry). Caspase 3 positive cells/field were counted every 2 h between 48 h and 66 h post-infection with AdN2ICD and controls adenovirus. Results were expressed as the percentage of caspase-positive ECs.

2.6. Animal model of vascular inflammation

The care and use of animals in this study complied with institutional guidelines. Male Sprague Dawley rats (300–400 g body weight) purchased from Charles River (Saint-Aubin, les Elbeuf, France) were injected intravenously, under anesthesia, with 10 μ g/kg of recombinant rat TNF α (PreproTech, Neuilly-Sur-Seine, France) or PBS as vehicle. Animals were euthanized for organ collection 1, 4 or 6 h after treatment. Rat RNA and proteins were isolated using TriZol[®] (Invitrogen) and RIPA (0.5% sodium deoxycholic acid, 0.1% SDS, 1% NP40, PBS, protease inhibitors) buffers, respectively, and were then treated as reported above.

2.7. Statistics

Data are represented as means \pm SE for replicates experiments ($n = 3$ independent experiments). Statistical analysis was performed

on Graphpad Prism[®] Software (Graphpad Software, San Diego, CA) with the parametric or Kruskal Wallis non-parametric analysis of variance test as appropriate. $p < 0.05$ was considered statistically significant.

3. Results

3.1. Constitutive and cytokine-regulated expression of the Notch2 and Notch4 receptors in vascular cells

To further characterize the vascular changes in expression and activity of the Notch pathway molecules upon inflammatory processes, we sought to analyze the pattern of mRNA levels for Notch receptors in resting and cytokine-activated vascular cells. To this aim, primary cultures of ECs from two different vascular beds (HAEC from arteries and HUVEC from veins) were treated for 0–24 h with recombinant tumor necrosis factor- α (TNF α) and transcript levels were analyzed by semi-quantitative RT-PCR. As shown in Fig. 1A and B, transcripts for the receptor Notch4 were detected in untreated vascular ECs whereas only minimal levels of Notch2 mRNA were found, indicating that quiescent ECs differentially express Notch receptors. TNF elicits an upregulation of Notch2 and a downregulation of Notch4 in both HAEC and HUVEC.

Quantitative PCRs confirmed that, in ECs, TNF α selectively modulates the mRNA steady-state levels for the Notch receptors. TNF α decreased transcript levels for Notch4 with a significant effect starting 2 h after treatment and maximal inhibition of $78 \pm 2\%$ as compared with basal levels ($*p < 0.05$) (Fig. 1C). In contrast, an enhanced mRNA level for Notch2 was found in response to TNF α , corresponding to a maximal 3.3 ± 0.3 -fold increase at 24 h ($*p < 0.05$) as compared to the basal mRNA level. Western blotting analysis (Fig. 1D) indicates that regulation in of Notch2, and 4 protein level paralleled changes in steady state mRNA levels for these molecules (up to 2.69 ± 1.26 and 0.28 ± 0.02 -fold the baseline for Notch2 and Notch4, respectively; $*p < 0.05$), suggesting that TNF α triggers an effective and selective Notch regulation at both mRNA and protein levels in ECs.

Next, we tested whether Notch expression could be regulated by cytokines other than TNF α . To address this question, qRT-PCR was used to compare mRNA levels for Notch2 and Notch4 in ECs treated with the cytokines TNF α , interleukin-1 β (IL1 β) and interferon γ (IFN γ) (Fig. 2). A comparable regulation in both time course and magnitude was observed for Notch2 in ECs activated with TNF α , IL1 β or IFN γ (up to a 2.3 ± 0.3 -fold increase for Notch2 as compared with untreated cells). Notch4 exhibited the same pattern of regulation upon TNF α and IL1 β stimulation, with a maximal decrease in mRNA of $65 \pm 5\%$ and $69 \pm 1\%$ for TNF α and IL1 β , respectively. Regulation of vascular cellular adhesion molecule-1 (VCAM-1) is shown as a control of EC activation. Similarly to

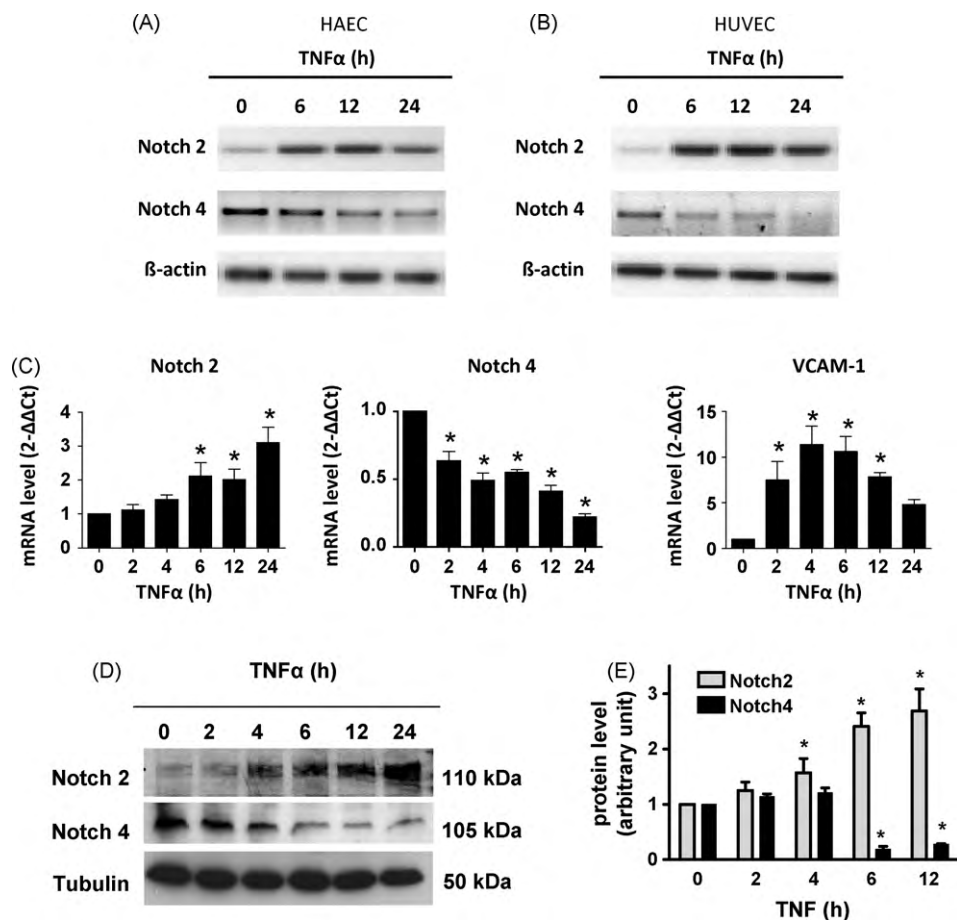


Fig. 1. Expression of Notch receptors in resting and TNF α -activated endothelial cells. Confluent cells monolayers were incubated with 100 U/mL TNF α for the indicated periods. Cells were lysed in parallel experiments to allow RNA and protein analysis. Semi-quantitative RT-PCR analysis of mRNA levels for Notch2 and 4 in vascular cells: HAEC (A), HUVEC (B). PCR products were separated on 1.2% agarose gels, blotted onto nylon membranes and hybridized with specific radiolabeled PCR probes. β -Actin mRNAs were amplified as normalization controls. Representative autoradiographs of three independent experiments are shown. (C) Real-time quantitative PCR for Notch2, Notch4, VCAM-1 in HAECs. Results shown are the mean \pm SEM from three independent experiments performed in duplicates and are expressed as relative expression, calculated according to the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method (* $p < 0.05$ versus control). (D) A representative analysis of Notch protein expression in HAEC by Western blotting. Blots were reprobbed with an anti-tubulin antibody to ensure equal loading. (E) Quantification of western blot analysis for Notch2 and Notch4 from at least 4 independent experiments.

VCAM-1, IFN γ had no significant effect on the reduction of Notch4 transcripts.

3.2. TNF α -mediated regulation of Notch effectors and impact on basal Notch activity in cultured ECs

Expression of Hairy/Enhancer of split (*hes*) and Hairy-related (*hey*/*hrt*/*herp*) transcription factors has been shown to be regulated by activation of Notch receptors [25]. Consequently, activity of the Notch pathway should be reflected by the expression of the *hes* and *hey* transcripts. Cells were incubated with recombinant TNF α for 0–24 h and mRNA levels for *hes*-1, 2, 3, 4, 5, 6, and 7 and *hey*1, 2 and 3 were analyzed by RT-PCR. As shown in Fig. 3A, ECs basally express significant levels of *hey*2, *hes*1 and *hes*2 mRNAs. We found that transcript levels of *hes*2, 4 and 6 were lower than *hes*1/*hey*1–2 (detection achieved at >30 cycles of PCR amplification, see also Table 1). In addition, no mRNA for *hes*3, 5 or 7 or *hey*3 was detected by RT-PCR (at 35 PCR cycles), suggesting that these effectors molecules are weakly expressed in ECs and play minor roles in Notch signal in ECs (data not shown) as compared to *hes*1/*hey*1–2. Among these molecular targets of Notch activity, only *hey*1 was found upregulated in TNF α -activated ECs. In contrast, after TNF α treatment, *hey*2 and *hes*1 showed a significant decrease in their expression.

In parallel, the expression of effector molecules in response to TNF α , IL1 β and IFN γ was investigated. As shown in Fig. 3, a drastic

downregulation of both *hes*-1 and *hey*-2 was found in response to TNF α ($79 \pm 1\%$ and $78 \pm 1\%$ inhibition at 24 h, respectively). Similarly, IL1 β induced a comparable regulation pattern with a maximal inhibition achieved at 6 h for *hes*1 and at 12 h for *hey*2 ($52 \pm 3\%$ and $71 \pm 4\%$ of decrease, respectively, as compared to untreated cells). In addition, the enhancement of *hey*1 (2.2 ± 0.3 -fold increase versus control) by TNF α was further observed with IL1 β (6.5 ± 1.6 -fold increase as compared to basal expression level). However, no significant regulation of these effector genes was obtained after IFN γ treatment, suggesting selective Notch receptors/effector regulations and therefore functions in response to inflammatory stimuli.

3.3. TNF-mediated regulation of Notch2 and Notch4: involvement of NF κ B, PI-3 kinase and MAP kinase signaling pathways

The selective effects of inflammatory cytokines by TNF α , IL1 β and IFN γ on Notch molecules also suggest that specific signaling pathways are implicated in this process. In ECs, TNF α activates several signaling pathways including the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-K), nuclear factor- κ B (NF κ B) and mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathways [26]. The respective involvement of these pathways in Notch regulation mediated by TNF α in ECs was examined. For this purpose, HAECs were pretreated with or without signaling pathway inhibitors (N-acetyl cysteine (NAC), PDTC, wortmannin and SP600125) for 1 h and then activated with TNF α for 24 h, a time point leading to maximal regulation as

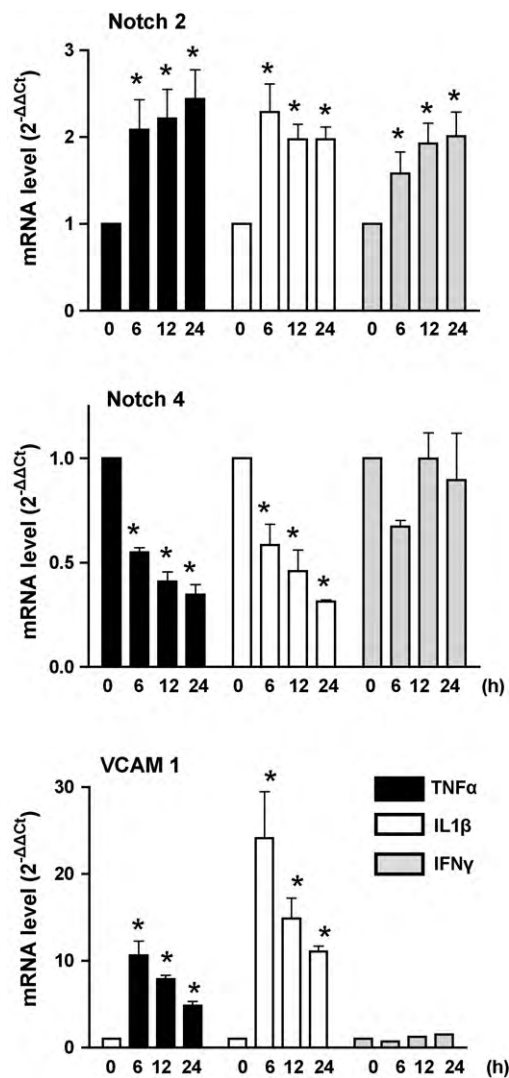


Fig. 2. Comparative effects of various cytokines on Notch signaling. HAECs were treated for 0, 6, 12 and 24 h with TNF α (100 U/mL), IL1 β (5 ng/mL) or IFN γ (100 U/mL). Transcriptional regulation was analyzed by Real-time quantitative RT-PCR for Notch2, Notch4 and VCAM-1. Results shown are the mean \pm SEM from three independent experiments performed in duplicates and are expressed as relative expression, calculated according to the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method, after normalization to HPRT levels (* $p < 0.05$ versus control).

shown above. Transcript levels for Notch2 and 4 were determined by qRT-PCR.

We found that blocking PI3-K using wortmannin does not affect Notch4 downregulation triggered by TNF α (Fig. 4). In contrast, Notch2 transcriptional upregulation was totally inhibited. Inhibition of the PI3K as well as inhibition of JNK also significantly prevents transcriptional regulation of hey1. An efficient prevention of TNF α -dependent Notch4 and hes1 downregulation was obtained after NF κ B inhibition using PDTC or NAC. The blockade of c-Jun N-terminal kinase (JNK) MAPK with SP600125 has no effect on Notch2, Notch4 and hes1 suggesting that this pathway is not involved. Overall, our data demonstrated for the first time that opposite regulations of Notch2 and Notch4 in activated EC require selective signaling pathways suggesting that Notch receptors exert non-redundant, complementary, functions upon inflammation. Moreover, our data showing that hes/hey effector molecules are also selectively regulated by the NF κ B and PI3-kinase pathways substantiated the hypothesis that Notch receptors control specific functions through the regulation of selected effectors (i.e. Notch2/hey1, Notch4/hes1).

Next, we used silencing experiments to mimic the changes in Notch4 expression mediated by TNF α in vascular ECs. To this aim, silencing of Notch4 was achieved using two different siRNAs targeting Notch4 (SiN4#1 and SiN4#2) or a scramble non-targeting siRNA (scramble) as we previously described [22]. Cells were then analyzed by qPCR for Notch2 and Notch4 transcript levels. Notch1 mRNA was used as a control for potential off-target effects. We found that silencing Notch4 has no significant effect on Notch1 and Notch2 expression indicating that downregulation of Notch4 does not trigger the regulation of Notch2. Conversely, we also observed that silencing or overexpressing Notch2 has no regulatory effect of Notch4 expression in ECs (data not shown).

Overall, our findings suggest that TNF α -mediated changes of Notch2 and 4 transcription may occur independently and are dependent, at least partially, on the PI3K and NF κ B pathways and support a major role for NF κ B in the control of Notch4 and hes1 [27].

3.4. Endothelial changes in Notch2 and Notch4 expression promote EC apoptosis

Next, to functionally assess the impact of Notch regulation, apoptosis assays were performed after modulation of Notch2 and/or Notch4 in cultured ECs. We used gene transfer to mimic the changes in both Notch2 and Notch4 mediated by TNF α in vascular ECs. To this aim, silencing of Notch4 was achieved as above using siRNAs while Notch2 was modulated and activated using an adenoviral vector encoding Notch2-ICD and GFP (AdN2ICD) as we previously described [23]. Controls include a non-targeting siRNA (scramble) and a recombinant adenovirus for the reporter gene GFP (AdGFP). Transduced and knock-down cells were then analyzed by Western blots for caspase activation. We found that silencing Notch4 and overexpression of Notch2 (NICD) similarly induce the cleavage of caspase-3 (Asp175) and caspase-7 (Asp198) indicating that both events are pro-apoptotic in vascular ECs (Fig. 5A). To confirm these results, caspase-3 activity was monitored in live ECs by videomicroscopy using a cell-permeable substrate (PhiPhiLux[®]) to detect real-time activation of caspase (Fig. 5B–E). The PhiPhiLux probe becomes fluorescent (red) when cleaved by active caspase-3. For these experiments, ECs were silenced for Notch4, transduced using AdN2ICD or both. Higher basal caspase-3 activity in treated cells compared to control reflects the pro-apoptotic effect of Notch modulation (Fig. 5B and C). Consistent with immunoblotting, we show a time-dependent increase in caspase-3 activity in ECs with a sustained Notch2 NICD expression or with a knocked-down for Notch4. Moreover, we found that combination of both further elicits caspase-3 activity suggesting that despite partly independent regulation of Notch2 and 4, apoptosis is a common effector mechanism. These data were further confirmed by annexin V labeling and facs analysis (data not shown).

3.5. Modulation of Notch2 and Notch4 in vascular inflammation *in vivo*

In order to establish a preliminary evidence *in vivo* for the biological relevance of our *in vitro* findings related to Notch regulation in activated ECs, we investigated Notch expression in rats treated with recombinant TNF α . EC activation was assessed by measuring VCAM-1 expression, a representative marker of EC activation *in vitro* and *in vivo* [7]. To induce vascular inflammation and EC activation, rats were treated intravenously with recombinant TNF α or vehicle as control. At 0–6 h postinjection, kidney, heart and lung were collected for analysis. First, basal expression of Notch2 and 4 transcripts in the different tissues from untreated rats was compared by qRT-PCR. As shown in Fig. 6A, the transcript level of Notch2 and 4 molecules varied greatly according to tissues,

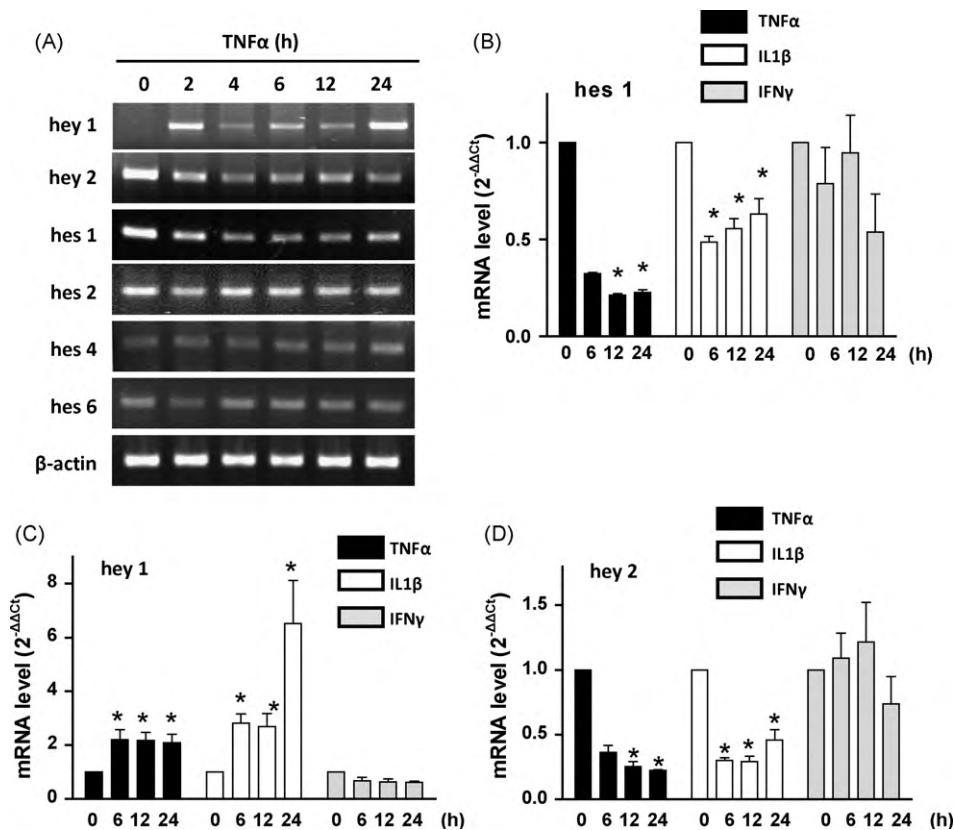


Fig. 3. Regulatory effects of TNF on Notch effectors and Notch activity. HAECs were treated for 0, 2, 6, 12 and 24 h with TNF α (100 U/mL), IL1 β (5 ng/mL) or IFN γ (100 U/mL). (A) Expression pattern of Notch effectors hes and hey was determined by semi-quantitative RT-PCR. PCR products were separated on 1.2% agarose gels and stained with ethidium bromide. β -actin mRNA was amplified as a control. Results are representative of three experiments performed. Transcriptional regulation was analyzed by real-time quantitative PCR for hes1 (B), hey1 (C) and hey2 (D). Results shown are the mean \pm SEM from three independent experiments performed in duplicates and are expressed as relative expression, calculated according to the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method, after normalization to HPRT levels (* $p < 0.05$ versus control).

with the highest expression levels consistently observed in the lung. The lower levels of Notch2 and 4 transcripts were found in the heart. Ratios of expression levels in the lung compared with the heart were 16.2 ± 3.0 -fold (* $p < 0.05$) for Notch2, and 6.4 ± 1.1 -fold (* $p < 0.05$) for Notch4.

Expression of Notch receptors was further examined in lung from rats treated with TNF α for 1, 4 and 6 h (Fig. 6B). Notch2 mRNAs were significantly and transiently increased (1.8 ± 0.1 -fold increase as compared to untreated rats; $p < 0.05$ at 1 h). In contrast, Notch4 was downregulated upon TNF α treatment, with a maximal 2.2 ± 0.1 -fold decrease in mRNA level, ($p < 0.05$ versus control). Western blotting for Notch2 and Notch4 further confirmed the respective up- and downregulation at the protein level in tissues (Fig. 6C). We also performed immunohistochemistry analysis on lung sections and we confirmed the decrease at endothelial level of Notch4 in TNF-treated animals (data not shown). Unlike Notch4, Notch2 is ubiquitously expressed in cells and tissues and we were not able to appreciate a clear quantitative increase in Notch2 expression in the endothelium (data not shown). Immunoblotting experiments also associated Notch regulation with pro-apoptotic events reflected by the activation of caspase-3 and caspase-7. The 19-kDa form of cleaved caspase-3 (Asp175) and the 20-kDa form of cleaved caspase-7 (Asp198) were detected in lung from TNF-treated but not in controls (Fig. 6D).

4. Discussion

Although the impact of the Notch pathway in several areas of vascular biology is now clearly established, its role in vascular inflammation at the endothelial level remains to be elucidated. A

large number of studies demonstrated, mostly through modulation of Notch pathway activity, that Notch is involved in EC differentiation, apoptosis and proliferation [12,16,28]. In addition, recent studies also investigated the effect of various effectors, such as soluble mediators of cell growth (VEGF or FGF-2) [28,29], differentiation (TGF β) [30] or activation (LPS) [31] on the Notch pathway in various cell types. In the present study, we asked whether inflammatory mediators could also modulate the Notch signaling and the pattern of Notch molecules expressed in vascular endothelial cells. To this aim, the effect of cytokines on Notch receptors expression and on Notch activity in human ECs was examined.

Here, we demonstrated that TNF α , the prototype of pro-inflammatory cytokines, drives a specific regulation of the Notch pathway in vascular ECs. In arterial ECs, TNF α strongly modulates the pattern of Notch molecules expression by decreasing Notch4 expression while increasing Notch2 expression. Changes in Notch levels were further observed at the protein level, and were associated with a reduction in hes-1 and hey-2 expression and CBF1 reporter gene activity as previously reported [23], suggesting that inflammation regulates both Notch expression and activity. Interestingly, regulation of Notch4 expression seems to be cytokine-specific since no regulatory effect was found in response to IFN γ , similar to VCAM-1 that is not affected by IFN γ . This TNF α -driven transcriptional regulation was found to be mostly mediated by the NF κ B and the PI3-kinase signaling pathways. *In vivo* analysis confirmed that in the lung, TNF α regulates Notch2 and Notch4 at both transcriptional and protein levels.

Four distinct Notch receptors, Notch1, 2, 3, and 4, and five different Notch ligands, Jagged-1 and 2, and Delta-1, 3, and 4, have been identified and characterized in mammals. ECs express

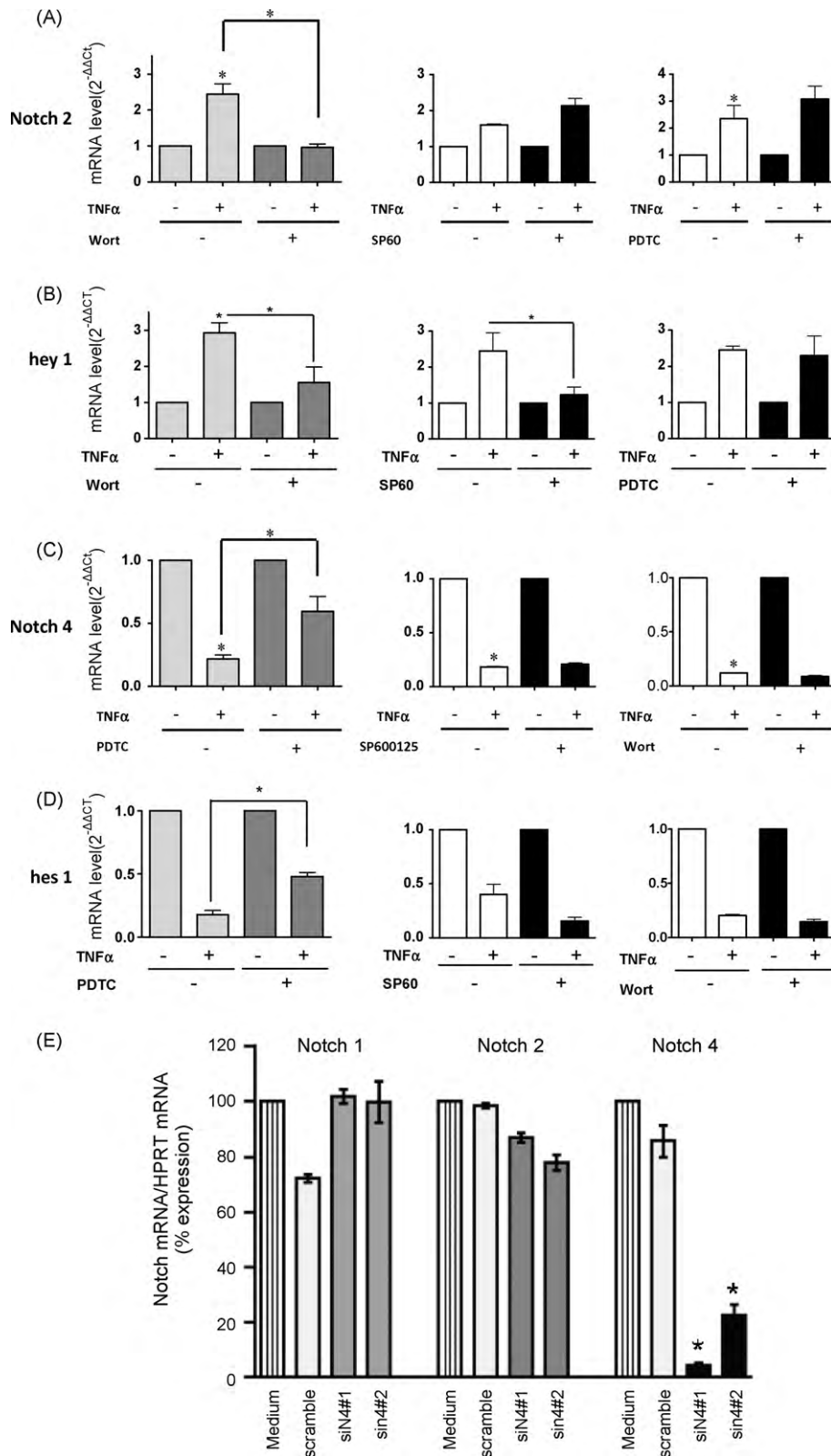


Fig. 4. Signaling pathways involved in TNF α -dependent Notch regulation. HAECs were preincubated with PDTc (100 μ M), SP600125 (10 μ M) or wortmannin (100 nM) for 1 h before 24 h treatment with TNF α (100 U/mL). Cells were lysed to allow RNA analysis by quantitative RT-PCR for Notch2 (A), hey1 (B), Notch4 (C) and hes1 (D). Results shown are the mean \pm SEM from three independent experiments and are expressed as relative expression, calculated according to the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method, after normalization to β -actin levels. * $p < 0.05$ versus TNF α -untreated cells (ctrl) and between non-pre-treated and pre-treated TNF α -activated cells with inhibitors. (E) ECs were transfected with siRNAs targeting Notch4 (SiN4#1 and SiN4#2) or a non-targeting scramble siRNA. Notch1, Notch2 and Notch4 mRNA steady states were analyzed by qRT-PCR 48 h post-transfection. Results shown are means \pm SEM from 3 independent experiments and are express as a percentage of control expression (medium).

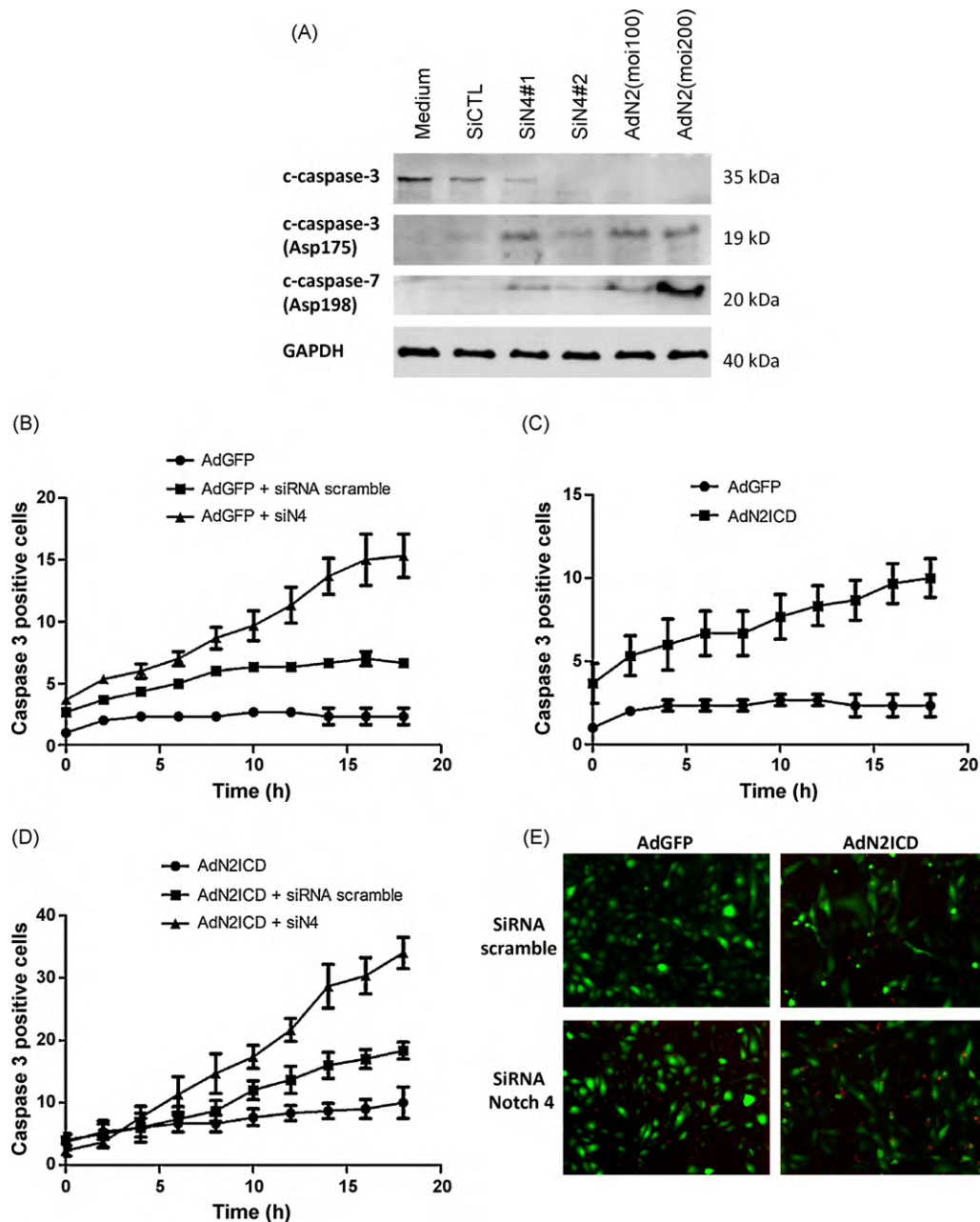


Fig. 5. TNF-mediated Notch regulation and EC apoptosis. (A) A representative Western blot analysis showing caspase-3 and caspase-7 cleavage in ECs silenced for Notch4 or overexpressing Notch2NICD. Immunoblotting was performed using specific anti-cleaved or total form of caspases antibodies. Blots were probed with anti-GAPDH antibodies (B, C, D, E) Caspase-3 activity in EC transduced with AdN2ICD or AdGFP and/or transfected with either non-targeting (scramble) or Notch4 siRNAs. Caspase-3-like activity was visualized in individual, live ECs by time lapse fluorescence videomicroscopy. Cultures were incubated with cell-permeable PhiPhiLux-G₂D₂ substrate at 37 °C, 5% CO₂. The quenched fluorescence PhiPhiLuxG₂D₂ substrate is cleaved intracellularly by caspase-3-like proteases, greatly enhancing red fluorescence. Non-apoptotic ECs expressing Notch2NICD-GFP or GFP alone appeared in green while apoptotic ECs are round red fluorescent cells. ECs were examined under a 20× objective and the total number of apoptotic cells determined by counting. (B, C, D) Results are expressed as the percentage of caspase-3 positive EC (**p* < 0.05). (E) Representative pictures of fields analyzed.

endothelium-specific Notch members, including Notch4 and Dll-4. However, whether normal, quiescent, human ECs express basal levels of other Notch receptors and ligands is not clearly established. Here we show that Notch2 is also expressed in cultured ECs and is upregulated in response to TNF α . However, the concomitant downregulation of Notch4 expression and Notch activity may suggest that Notch4 is the major Notch receptor in arterial ECs or that Notch2 partly exerts its functions by a non-canonical mechanism.

In contrast to ECs and consistent with previous data [32], we also found that vascular SMCs express Notch2 and Notch3 but not Notch4 at mRNA level. Consistent with our results on ECs, vSMCs

responded to TNF α with a significant upregulation of Notch2 (about a 4.2-fold increase as compared to untreated cells) and a strong downregulation of Notch3 expression (data not shown).

Associated with the constitutive expression of Notch receptors, we found a basal expression of a selective pattern of effector molecules of the *Hairy/Enhancer of split* (Hes) and Hairy-related transcription factors (Hey, also known as Hrt, Hesr, Hey, CHF, grl, and Herp) family. Previous studies showed basal transcript levels for hes1, hey1 (herp2, hrt1, hesr1) and hey2 (herp1, hrt2, hesr2) in ECs [25,33]. Consistent with these results, we reported significant expression of hes-1 and 2 and hey-1 and 2 associated with a basal CBF1/luciferase activity (data not shown), confirming that endoge-

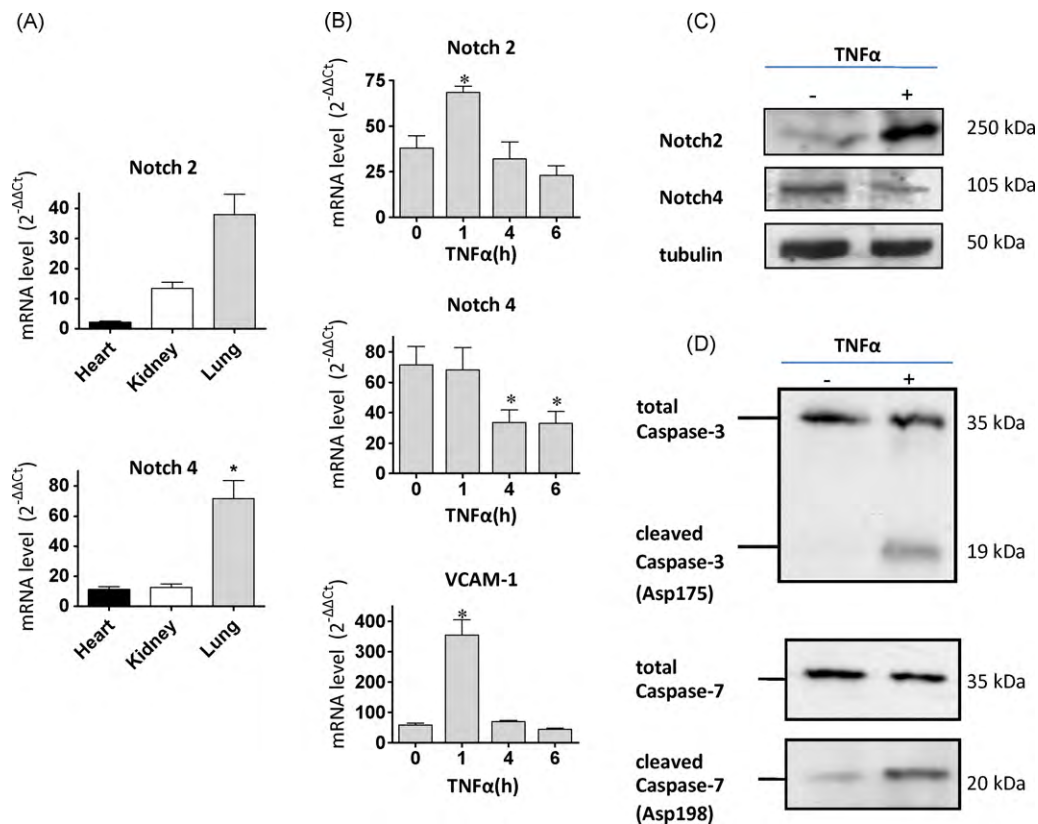


Fig. 6. TNF α -dependent Notch regulation upon inflammation *in vivo*. Rats ($n = 3$) were treated intravenously with rat TNF α (10 μ g/kg) for 0, 1, 4 or 6 h. Lungs, heart and kidneys were collected and frozen for mRNA and protein analysis. Real-time quantitative PCR was used for mRNA analysis. Results shown are the mean \pm SEM of three independent experiments and are expressed as relative expression, calculated according to the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method, after normalization with β -actin levels (* $p < 0.05$ versus control). (A) Basal levels of Notch2 and Notch4 transcripts in heart, kidney and lung from untreated rats; * $p < 0.05$ versus transcript level in heart. (B) Time-course analysis of transcript levels in lung in response to TNF α (* $p < 0.05$ versus untreated rats). (C, D) Western blotting for Notch2, Notch4, cleaved (Asp175) and total caspase-3, cleaved (Asp198) and total caspase-7 and tubulin in lung in response to TNF α (4 h). A representative experiment out of 3 independent experiments is shown.

nous Notch activity occurs in quiescent ECs and is probably implicated in the maintenance of endothelium quiescence [34]. A microarray comparison of large series of human EC lines confirmed arterial-specific expression for hey2 [35]. Further, those authors showed that ectopic expression of hey2 in HUVECs specifically induces expression of a series of genes that are characteristic of arterial endothelia, implicating hey2 as a key regulator of the arterial phenotype. Consistent with our results, Espinosa et al. provided evidence that TNF α triggers an important decrease in the level of hes1 mRNA, while a lower effect was found on hey1 [36]. Our findings further indicate that, consistent with an overall decreased expression for the major effector molecules hes1 and hey1, TNF α reduces basal CBF1 reporter activity in activated ECs. Considering that CBF1 activity reflects canonical Notch pathway activity, we may extrapolate that TNF α decreases Notch activity in ECs.

The functional consequences of Notch modulation mediated by TNF α in the endothelium appear to promote EC apoptosis. Notch4 has been implicated in the control of proliferation, apoptosis and migration of SMCs and ECs [14,16,37]. Notch2 has mostly been involved in monocyte and T lymphocyte maturation and differentiation [38–40]. Its role in EC biology is still unclear. We recently demonstrated that Notch2 signaling sensitizes EC to apoptosis [23]. TNF elicits a broad array of cellular effects via two receptors TNFR1 and TNFR2. TNFR1 mediates inflammation and cell death while TNFR2 serves to enhance TNFR1-induced apoptosis or to promote cell activation, migration, growth or proliferation in a cell-specific manner [41]. Here, our results suggest that concomitant changes in Notch2 and Notch4 expression elicited by TNF α may have an additive pro-apoptotic effect that triggers endothelial injury and vascular damage.

To conclude, inflammatory cytokines trigger a selective expression pattern of Notch receptors in the endothelium associated with a reduced canonical Notch activity. Consistent with previous models where growth factors modulate the expression of Notch receptors and ligands at both qualitative and quantitative levels, our findings suggest that inflammation may provide additional control of Notch signaling.

Contributors

T.Q. contribute most of the experimental work and participated in the design or the study, data analysis and drafting the manuscript. J.D. contributed significantly to the *in vitro* experiments and apoptosis assays. S.C. performed initial *in vivo* experiments and analysis. B.C. performed conception and design of the study, contributed substantially to interpretation of the data and drafting of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

The authors thank Flora Coulon and Nathalie Gérard for excellent technical assistance and 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 grants from La Société Francophone de Transplantation, La Société de Néphrologie and La Fondation Progreffe. T.Q. was supported by a grant from la Fondation pour la Recherche Médicale.

References

- [1] Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* 1999;284(5415):770–6.
- [2] Iso T, Hamamori Y, Keddes L. Notch signaling in vascular development. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23(4):543–53.
- [3] Radtke F, Raj K. The role of Notch in tumorigenesis: oncogene or tumour suppressor? *Nat Rev Cancer* 2003;3(10):756–67.
- [4] Maillard I, Adler SH, Pear WS. Notch and the immune system. *Immunity* 2003;19(6):781–91.
- [5] Limbourg FP, Takeshita K, Radtke F, Bronson RT, Chin MT, Liao JK. Essential role of endothelial Notch1 in angiogenesis. *Circulation* 2005;111(14):1826–32.
- [6] Pober JS. Endothelial activation: intracellular signaling pathways. *Arthritis Res* 2002;4(Suppl. 3):S109–16.
- [7] Mantovani A, Bussolino F, Introna M. Cytokine regulation of endothelial cell function: from molecular level to the bedside. *Immunol Today* 1997;18(5):231–40.
- [8] Pober JS. Immunobiology of human vascular endothelium. *Immunity* 1999;19(2–3):225–32.
- [9] Pober JS, Cotran RS. The role of endothelial cells in inflammation. *Transplantation* 1990;50:537–44.
- [10] Briscoe DM, Alexander SI, Lichtman AH. Interactions between T lymphocytes and endothelial cells in allograft rejection. *Curr Opin Immunol* 1998;10(5):525–31.
- [11] Leong KG, Karsan A. Recent insights into the role of Notch signaling in tumorigenesis. *Blood* 2006;107(6):2223–33.
- [12] Nosedá M, McLean G, Niessen K, Chang L, Pollet I, Montpetit R, et al. Notch activation results in phenotypic and functional changes consistent with endothelial-to-mesenchymal transformation. *Circ Res* 2004;94(7):910–7.
- [13] Williams CK, Li JL, Murga M, Harris AL, Tosato G. Up-regulation of the Notch ligand Delta-like 4 inhibits VEGF-induced endothelial cell function. *Blood* 2006;107(3):931–9.
- [14] MacKenzie F, Duriez P, Wong F, Nosedá M, Karsan A. Notch4 inhibits endothelial apoptosis via RBP-J(kappa)-dependent and -independent pathways. *J Biol Chem* 2004;279(12):11657–63.
- [15] Ridgway J, Zhang G, Wu Y, Stawicki S, Liang WC, Chantry Y, et al. Inhibition of Dll4 signalling inhibits tumour growth by deregulating angiogenesis. *Nature* 2006;444(7122):1083–7.
- [16] Nosedá M, Chang L, McLean G, Grim JE, Clurman BE, Smith LL, et al. Notch activation induces endothelial cell cycle arrest and participates in contact inhibition: role of p21Cip1 repression. *Mol Cell Biol* 2004;24(20):8813–22.
- [17] Boulday G, Coupel S, Coulon F, Soullillou JP, Charreau B. Antigrft antibody-mediated expression of metalloproteinases on endothelial cells. Differential expression of TIMP-1 and ADAM-10 depends on antibody specificity and isotype. *Circ Res* 2001;88(4):430–7.
- [18] Boulday G, Coulon F, Fraser CC, Soullillou JP, Charreau B. Transcriptional up-regulation of the signaling regulatory protein LNK in activated endothelial cells. *Transplantation* 2002;74(9):1352–4.
- [19] Coupel S, Leboeuf F, Boulday G, Soullillou 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):2429–39.
- [20] 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. *J Biol Chem* 2006;281(29):20148–59.
- [21] Six E, Ndiaye D, Laabi Y, Brou C, Gupta-Rossi N, Israel A, et al. The Notch ligand Delta1 is sequentially cleaved by an ADAM protease and gamma-secretase. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100(13):7638–43.
- [22] Quillard T, Coupel S, Coulon F, Fitau J, Chatelais M, Cuturi MC, et al. Notch4 activity elicits endothelial cell activation and apoptosis: implication for transplant arteriosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008;28(12):2258–65.
- [23] Quillard T, Devalliere J, Chatelais M, Coulon F, Seveno C, Romagnoli M, et al. Notch2 signaling sensitizes endothelial cells to apoptosis by negatively regulating the key protective molecule survivin. *PLoS One* 2009;4(12):e8244.
- [24] 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):402–8.
- [25] Iso T, Keddes L, Hamamori Y. HES and HERP families: multiple effectors of the Notch signaling pathway. *J Cell Physiol* 2003;194(3):237–55.
- [26] Madge LA, Pober JS. TNF signaling in vascular endothelial cells. *Exp Mol Pathol* 2001;70(3):317–25.
- [27] Aguilera C, Hoya-Arias R, Haegeman G, Espinosa L, Bigas A. Recruitment of IkappaBalpha to the hes1 promoter is associated with transcriptional repression. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101(47):16537–42.
- [28] Liu ZJ, Shirakawa T, Li Y, Soma A, Oka M, Dotto GP, et al. 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(1):14–25.
- [29] Matsumoto T, Turesson I, Book M, Gerwins P, Claesson-Welsh L. p38 MAP kinase negatively regulates endothelial cell survival, proliferation, and differentiation in FGF-2-stimulated angiogenesis. *J Cell Biol* 2002;156(1):149–60.
- [30] Hiratochi M, Nagase H, Kuramochi Y, Koh CS, Ohkawara T, Nakayama K. 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* 2007;35(3):912–22.
- [31] Monsalve E, Perez MA, Rubio A, Ruiz-Hidalgo MJ, Baladron V, Garcia-Ramirez JJ, et al. Notch-1 up-regulation and signaling following macrophage activation modulates gene expression patterns known to affect antigen-presenting capacity and cytotoxic activity. *J Immunol* 2006;176(9):5362–73.
- [32] Krebs LT, Xue Y, Norton CR, Shutter JR, Maguire M, Sundberg JP, et al. Notch signaling is essential for vascular morphogenesis in mice. *Genes Dev* 2000;14(11):1343–52.
- [33] Henderson AM, Wang SJ, Taylor AC, Aitkenhead M, Hughes CC. The basic helix-loop-helix transcription factor HESR1 regulates endothelial cell tube formation. *J Biol Chem* 2001;276(9):6169–76.
- [34] Liu ZJ, Xiao M, Balint K, Soma A, Pinnix CC, Capobianco AJ, et al. Inhibition of endothelial cell proliferation by Notch1 signaling is mediated by repressing MAPK and PI3K/Akt pathways and requires MAML1. *FASEB J* 2006;20(7):1009–11.
- [35] Chi JT, Chang HY, Haraldsen G, Jahnsen FL, Troyanskaya OG, Chang DS, et al. Endothelial cell diversity revealed by global expression profiling. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100(19):10623–8.
- [36] Espinosa L, Ingles-Esteve J, Robert-Moreno A, Bigas A. IkappaBalpha and p65 regulate the cytoplasmic shuttling of nuclear corepressors: cross-talk between Notch and NFkappaB pathways. *Mol Biol Cell* 2003;14(2):491–502.
- [37] Sweeney C, Morrow D, Birney YA, Coyle S, Hennessy C, Scheller A, et al. 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* 2004;18(12):1421–3.
- [38] Ohishi K, Varnum-Finney B, Flowers D, Anasetti C, Myerson D, Bernstein ID. Monocytes express high amounts of Notch and undergo cytokine specific apoptosis following interaction with the Notch ligand, Delta-1. *Blood* 2000;95(9):2847–54.
- [39] Saito T, Chiba S, Ichikawa M, Kunisato A, Asai T, Shimizu K, et al. Notch2 is preferentially expressed in mature B cells and indispensable for marginal zone B lineage development. *Immunity* 2003;18(5):675–85.
- [40] 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):8637–50.
- [41] Al-Lamki RS, Wang J, Vandenabeele P, Bradley JA, Thiru S, Luo D, et al. TNFR1- and TNFR2-mediated signaling pathways in human kidney are cell type-specific and differentially contribute to renal injury. *FASEB J* 2005;19(12):1637–45.

Article 4 : L'activation de Notch2 dans les CE induit l'apoptose en bloquant l'expression de la survivine

Résumé :

Les molécules de la voie Notch régulent des fonctions essentielles de la biologie vasculaire. Il a précédemment été 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 (Quillard et al., 2008). Si l'importance de Notch4 dans le contrôle de la prolifération, de la différenciation et de l'apoptose des CE est avérée, peu de données concernent l'implication de Notch2 dans la biologie endothéliale.

Cette étude poursuit l'analyse des interactions entre la voie du TNF α et celle de Notch dans les cultures primaires de CE humaines. En particulier, nous confirmons que le TNF α augmente fortement l'expression et l'activation du récepteur Notch2 dans les CE qui est corrélée à une forte induction du gène effecteur hey1. Fonctionnellement, l'expression du domaine actif de Notch2 (N2ICD) dans les cultures primaires 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. Cet effet est assuré par la répression de l'expression de plusieurs molécules clé impliquées dans le contrôle de la survie cellulaire. L'activation de Notch2 mène notamment à une forte diminution de l'expression transcriptionnelle et protéique de la survivine. Au contraire, une augmentation de la survivine est obtenue à la suite de l'inactivation sélective de Notch2, confirmant le contrôle de l'expression de la survivine par Notch2. Enfin, une 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 de la survie cellulaire et désigne la survivine comme un effecteur majeur de la fonction pro-apoptotique de Notch2.

Notch2 Signaling Sensitizes Endothelial Cells to Apoptosis by Negatively Regulating the Key Protective Molecule Survivin

Thibaut Quillard^{1,2,3#a}, Julie Devalliere^{1,2,3}, Mathias Chatelais^{1,2,3}, Flora Coulon^{1,2,3}, Céline Séveno⁴, Mathilde Romagnoli^{4#b}, Sophie Barillé Nion⁴, Béatrice Charreau^{1,2,3*}

1 INSERM, UMR643, Nantes, France, 2 CHU Nantes, Institut de Transplantation et de Recherche en Transplantation, ITERT, Nantes, France, 3 Université de Nantes, Faculté de Médecine, Nantes, France, 4 INSERM, UMR 892, Nantes, France

Abstract

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

Methodology/Principal Findings: Here, we provide evidence for a novel link between Notch and TNF signaling, where Notch2 is upregulated and activated in response to TNF. Forced expression of Notch2 intracellular domain in cultured ECs promotes apoptosis and allows the significant downregulation of several cell-death-related transcripts in a dose-dependent 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 ECs, indicating that survivin expression is controlled at the Notch level. Moreover, Notch2 silencing and ectopic expression of survivin, but not XIAP or Bcl2, rescued ECs from TNF and Notch2-mediated apoptosis, respectively.

Conclusions/Significance: In conclusion, TNF signaling activates Notch2 that sensitizes ECs to apoptosis via modulation of the key apoptosis regulator survivin. Overall, our findings also indicate that specific Notch receptors control distinct functions in vascular cells and inflammatory cytokines contribute to this specificity.

Citation: Quillard T, Devalliere J, Chatelais M, Coulon F, Séveno C, et al. (2009) Notch2 Signaling Sensitizes Endothelial Cells to Apoptosis by Negatively Regulating the Key Protective Molecule Survivin. PLoS ONE 4(12): e8244. doi:10.1371/journal.pone.0008244

Editor: Yihai Cao, Karolinska Institutet, Sweden

Received: July 3, 2009; **Accepted:** November 9, 2009; **Published:** December 11, 2009

Copyright: © 2009 Quillard et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: 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. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: Beatrice.Charreau@univ-nantes.fr

#a Current address: Cardiovascular Medicine, Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, United States of America

#b Current address: Department of Biochemistry, Boston University School of Medicine, Boston, Massachusetts, United States of America

Introduction

Notch signaling pathway regulates a broad array of cell fate decisions 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 (Notch1-4) and 5 ligands (Delta-like [Dll]-1, Dll3, Dll4, Jagged1 and Jagged2) have been identified [1]. 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 CSL, removing the repression and allowing for target genes (*hes*, *hey*) transcription [2].

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 more ubiquitously [3]. In the vasculature, Notch1 and Notch4 are predominantly endothelial, prominent in both arteries and veins while the expression of Notch2 has been reported in pulmonary endothelium [4]. 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 homeostasis [5] and is involved in vasculogenesis, angiogenesis, differentiation, vascular remodeling, and maturation [6]. Combined deletion of *Notch1* and *Notch4* genes enhances the defects in vasculature remodeling observed in Notch1 single knock-out mice [7]. Endothelial cell (EC)-specific

expression of an activated form of Notch4 leads to embryonic lethality with abnormal vessel structure and patterning [8]. Constitutive activation of Notch4 in ECs also causes defects in vascular remodeling [8]. *In vitro* experiments also demonstrate that Notch4 activation protects ECs from apoptosis, promotes endothelial-to-mesenchymal trans-differentiation and blocks both proliferation and angiogenesis [9,10].

Endothelial cells control vascular tone, leukocyte adhesion and thrombosis by fine-tuned regulation of many cell surface and soluble molecules [11]. 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 ECs to promote the inflammatory response. In cultured human ECs, human TNF causes apoptosis, especially in the presence of RNA or protein synthesis inhibitors such as actinomycin D or cycloheximide (CHX), respectively. TNF activates both NF κ B and AP-1 in ECs, leading to the expression of pro-inflammatory proteins, such as E-selectin (CD62E), ICAM-1 (CD54), VCAM-1 (CD106) and IL-8. TNF also promotes expression of an array of “protective” genes including the zinc finger protein A20, heme-oxygenase-1 (HO-1) and Bcl-xL [12]. It has been suggested that Notch is necessary for the establishment and/or maintenance of quiescent EC phenotype [10]. 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 arteriosclerosis [13]. Although the importance of Notch4 in controlling EC proliferation, differentiation and survival has been established, little is known about the role of Notch2 expressed on vascular endothelium. This study further investigates the regulatory crosstalk between TNF signaling and Notch receptors expression and activity in primary cultures of human vascular ECs. In particular, we show that TNF strongly upregulates Notch2 on vascular ECs. Moreover, the present work establishes the direct contribution of Notch2 signaling in the transcriptional regulation of several pro- and anti-apoptotic molecules. Both forced Notch2 NICD (N2ICD) 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 by TNF 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.

Materials and Methods

Ethics Statement

Informed written consent was obtained from patients. The study was performed according to the guidelines of the local ethics committee (Comité Consultatif de Protection des Personnes dans la Recherche Biomédicale [CCPRB], CHU de Nantes, France).

Cell Culture and Reagents

Primary ECs cultures from human artery (HAEC) and umbilical vein (HUVEC) were isolated and grown in early passages (2–6) as we previously reported [14]. Human aortic endothelial cells (HAECs) were isolated from unused aortic pieces collected at the time of kidney transplantation and harvested according to good medical practice and stored in the DIVAT Biocollection (French

Health Minister Project no. 02G55). HUVEC were only used for plasmid transfection experiments. ECs 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 μ g/mL), gentamicin (50 μ g/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). To induce EC apoptosis, ECs were pre-treated 1 h with 100 μ M pyrrolidine dithiocarbamate (PDT, Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA) before TNF addition and incubation for 24 h. To protect ECs from apoptosis, AdN2ICD-transduced cells were cultured for 48 h in presence of zvad (R&D systems).

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) [15]. Cells were treated with DAPT (10 μ M, N-[N-(3,5-Difluorophenacetyl)-L-alanyl]-Sphenylglycine t-butyl ester, Sigma–Aldrich) or co-transfected with the N2IC/MSCV plasmid encoding Notch2 NICD as a positive control for Notch activity [16]. 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. 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, Bcl2 and XIAP full cDNAs were cloned into pcDNA3.1 vector. For gene silencing, 10⁵ HAECs 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). High transfection efficiency was verified with fluorescent siRNA (over 85%) (fluorescent Block-IT[®], invitrogen). Validation of siRNA and functional assays were performed 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 described [17]. The recombinant adenoviruses AdTrack-GFP and –AdNull (Ad DI324) without GFP cDNA were used as a control

(AdGFP, AdNull). Efficiency and adenoviral infection and GFP expression are shown in the supplemental Figure S1. When applicable, dose-reponse of multiplicity of infection (moi) were performed to confirm/validate our findings. HAEC or HUVEC were cultured 70–90% confluence and infected with a moi of 30/cell or 300 for AdN2ICD and AdNull and 5 moi or 50 for AdGFP, respectively. Adenoviral infection was carried out in ECGM supplemented with 1% FCS for 3 h 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).

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^{-ΔΔCt} method, as previously described [18]. Primers for Notch1 (5'-GACGGACCCAACACTTACAC-3'; 5'-TCAGGCAGAAGCAG-AGGTAG-3'), Notch2 (5'-GCAGGAGGTGGATGTGTTAG-3'; 5'-CCAGGATCAGGGGTGTAGAG-3'), Notch3 (5'-CTCAT-CCGAAACCGCTCTAC-3'; 5'-AGTCTCTCTGGGCTACGT-C-3'), Notch4 (5'-TGTTTGGATGGCTACGACTGT-3'; 5'-TC-CTTACCCAGAGTCTACC-3'), hey1 (5'-CAGGCAACAGG-GGGTAAAGG-3'; 5'-GTGGAGCGGATGATGGTGGT-3') and β-actin (5'-TCTGGCACACACCTTCTAC-3'; 5'-CAGCTTCT-CCTTAATGTCAC-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 Euro-Lab, 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 ECs transfected with pTrackCMV-N2ICD were subjected to Notch2 labelling with Notch2 antibody (DSHB).

Cell Viability and Apoptosis Analysis

DNA content. Cellular DNA content analyses were performed by flow cytometry as follows: 48 h after transfection, ECs 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), 100 μg/mL RNase A (Sigma-Aldrich) in PBS (1 ml/1×10⁶ cells). For specific apoptosis detection, ECs were harvested, washed and resuspended in 100 μl of Binding Buffer (10 mM HEPES, pH 7.4, 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl₂) with 5 μl of annexin V-APC (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) for 15 min and with 50 μl/mL of PI for 5 min. Fluorescence was measured on 10,000 cells/sample using a LSR II® (BD Biosciences) and analyzed using FlowJo® software (Tree Star, Inc.). Results shown are representative of at least 3 independent experiments.

Measurement of caspase activity. Caspases-3 and -7 activity was assessed using the Caspase-Glo® 3/7 Assay, according to the manufacturer's recommendation (Promega, Charbonnières, France). Briefly, 10 μg of cell lysate were incubated with caspase substrate and fluorescence was analyzed for 2 h with a Fluoroskan Ascent™ (Thermo Scientific, Saint-Herblain, France).

Caspase activity was also analyzed by western blot using antibodies against Cleaved Caspase-3 (Asp175), Cleaved Caspase-6 (Asp162), Cleaved Caspase-7 (Asp198), Cleaved Caspase-9 (Asp315), Cleaved Caspase-9 (Asp330) and Cleaved PARP (Asp214) from CST and antibody against total caspase-3 (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA).

The cell-permeable fluorogenic peptidic substrate PhiPhiLux-G2D2 (Oncolmmunin, Gaithersburg, MD) containing the cleavage site DEVD was used to monitor caspase-3-like activity in intact cells. Cells were incubated with the substrate solution for 1 h at 37°C in the dark, according to the manufacturer's instructions. Caspase 3 activation/apoptosis was followed during 18 h by time lapse imaging using a microscope DMI6000B (Leica Microsystems SAS, Rueil Malmaison) equipped with an objective lens X40 (HCX FL Plan), and a CCD camera (Coolsnap HQ2, Photometrics Roper Scientifics SAS Evry). Caspase 3 positive cells/fied were counted every 2 h between 48 h and 66 h post-infection with AdN2ICD and controls adenovirus. Results were expressed as the percentage of caspase-positive ECs.

Cell Proliferation

Cells were seeded at 25% of confluence, treated with FGF-2 (R&D Systems) and pulsed for 16 h with 0.5 μCi/well [methyl-³H] thymidine (Amersham, Les Ulis, France). Thymidine incorporation was measured using a scintillant counter (Top count NXT, Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, MA, USA).

Statistics

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

Results

TNF Induces Notch2 Signaling in Vascular ECs

TNF in human vascular ECs activates signaling pathways that regulate coordinately the transcription of a large set of molecules involved in inflammation, coagulation, thrombosis, vascular tone, immune response [11]. Moreover, TNF signaling also regulates a

fine tune balance of pro- and anti-apoptotic factors that control EC survival and, ultimately, vascular injury and remodeling [19]. Consequently, the first aim of this study was to investigate how TNF signaling may control the expression of Notch receptors (Notch1, 2, 3 and 4) in cytokine-activated ECs. 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 decreases transcript levels for Notch1, Notch3 and Notch4 with a significant effect starting 2 h after treatment and with a maximal inhibition at 24 h of $49\pm 7\%$, $88\pm 2\%$ and $78\pm 2\%$ for Notch1, 3 and 4 as compared with basal levels ($p<0.05$ for all). In contrast, an enhanced mRNA level for Notch2 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–D). TNF also triggers the activation of Notch2 signaling as reflected by the induction of the activated cleaved-form of Notch2 receptor (c-Notch2) (Figure 1B). Expression of, Hairy/Enhancer of split (hes) and Hairy-related (hey) transcription factors has been shown to be dependent on Notch receptors activation [2]. Among these

molecular targets of Notch activity, TNF was found to drive a selective increase in hey1 mRNA (Figure 1E) while, in contrary, hes1 and hey2 mRNA exhibit a significant decrease (data not shown). Activation of Notch signaling in response to TNF, reflected by hey1 transcription, measure by qRT-PCR, was strongly abrogated in the presence of a γ -secretase inhibitor (DAPT) (Figure 1F). Together, these findings indicate that TNF strongly modulates the pattern of Notch receptors expressed in ECs by increasing Notch2 expression and activity in parallel to the induction of hey1 effector gene.

Notch2 Signaling Elicits EC Death and Apoptosis

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 human vascular ECs. To this end, we first generated a recombinant adenoviral vector encoding the intra-cellular domain of Notch2 (N2ICD) and GFP as a reporter gene (AdN2ICD). Controls were ECs transduced with a recombinant adenovirus encoding GFP alone and empty vector (AdGFP and AdNull) to account for any effects that may be due to adenoviral infection or/and GFP expression.

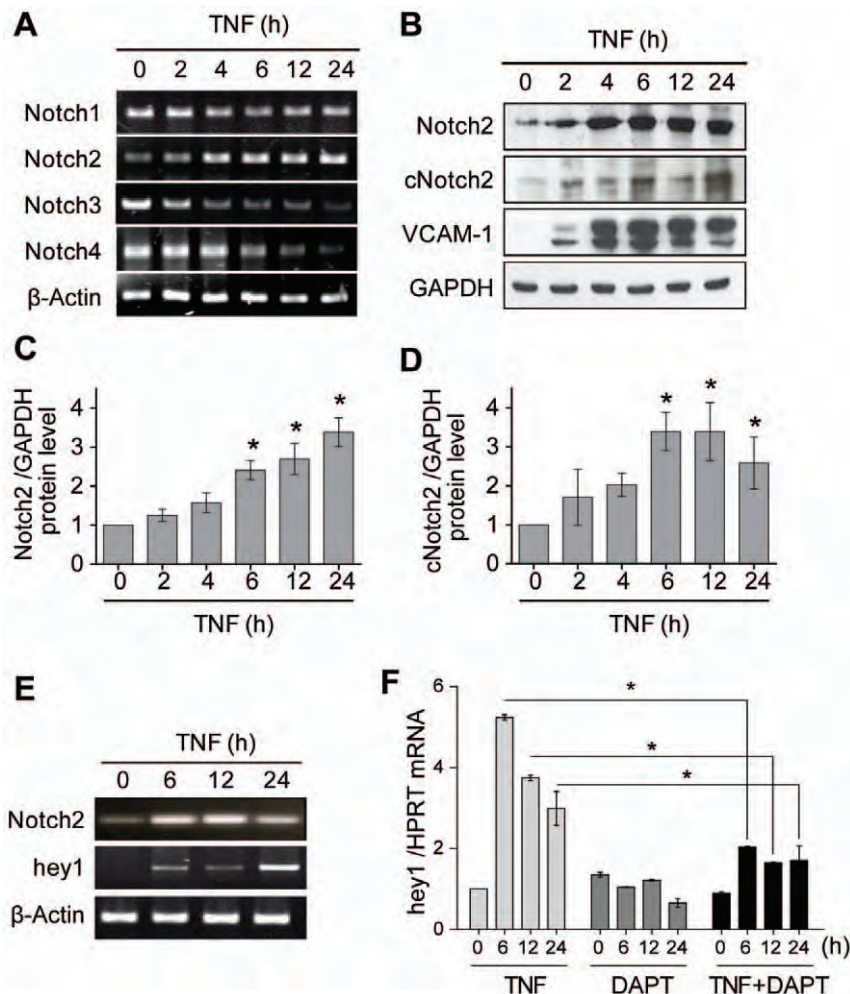


Figure 1. Regulation of Notch2 signaling in response to TNF. (A) RT-PCR for Notch1-4 in ECs treated with TNF. A western blotting analysis (B) and its quantification showing the expression of the native Notch2 (C) and the activated cleaved form (cNotch2) in response to TNF (D). (E) RT-PCR for Notch2 and hey1 in ECs treated with TNF. (F) qRT-PCR for hey1 in EC stimulated with TNF and DAPT. * $p<0.05$ versus controls. doi:10.1371/journal.pone.0008244.g001

Western blot analysis further indicates that, N2ICD expression is dose-dependent in transduced ECs (supplemental Figure S1C). Validation of the N2ICD transgene was also attested by its nuclear translocation as well as its ability to promote canonical Notch pathway activity (supplemental Figure S1D-E).

Notch2 signaling was then tested for regulation of EC survival. First, the effect of N2ICD on EC viability was examined by a DNA content analysis from 24 h to 72 h after infection (Figure 2A). At 24 h, no significant effect was observed. At 48 h, a significant decrease in cell viability ($46.5 \pm 5.9\%$) was found when ECs were infected with AdN2ICD at moi 40 while a lower dose of virus (moi 20) decreases cell survival by $31.8 \pm 8.4\%$ indicating that N2ICD-induced cell death is a dose-dependent process. Finally, at 72 h post-infection, in contrast to AdGFP and AdNull controls that did not alter cell survival, AdN2ICD was sufficient to drastically induce cell death ($40.0 \pm 14.0\%$ and $67.5 \pm 6.1\%$ of cell death for moi 20 and 40, respectively). To test whether EC death reflected apoptosis, ECs were labeled with AnnexinV and Propidium iodide 72 h after infection and apoptotic cells (AnnV+) were detected by flow cytometry. As shown in Figure 2B, N2ICD strongly induces apoptosis in a dose dependent manner. AdN2ICD transduced ECs displayed 58.2% and 77.5% of apoptotic cells for moi 20 and 40, respectively. In contrary, no effect was observed after AdGFP infection or with the corresponding empty Adenovirus at a moi of 40 thus attesting that the deleterious effect of AdN2ICD was not due to GFP nor to the viral charge. No necrotic cells (AnnV-PI+) were detected. To further characterize N2ICD-mediated apoptosis, we first used a PhiPhiLux™ system to detect real-time activation of caspase in live cells. PhiPhiLux incorporated into a cell is specifically cleaved by caspase-3 or caspase-7, and the cleaved products give fluorescence that can be detected by fluorescent Time lapse videomicroscopy imaging. After 48 h post-infection, ECs were subjected to time lapse imaging for 18 h (Figure 2C). Caspase3/7 positive cells/field (in %) were counted every 2 hours during the experiment (Figure 2D). This experimental setting allowed us to follow AdN2ICD-mediated apoptosis induction in real time. As shown for AnnexinV staining, AdN2ICD was associated with a high number of caspase3/7-dependent apoptosis (37%) as compared to AdGFP and AdNull controls (5% and 2%, respectively) 66 h after infection.

Moreover, western blots were used to examine cleavage of caspase-3, -6, -7 and PARP in response to Notch2 NICD (Figure 2E). The 17-kDa form of cleaved caspase-3 was detected in EC overexpressing N2ICD at 48 and 72 h and parallels a decrease in full caspase-3 expression. Correlated to caspase-3 activation, cleavage of caspase-7 and PARP were also observed. In contrast, no cleavage of caspase-6 and -9 was found (data not shown). To quantify caspase activation by N2ICD, we used a colorimetric assay for caspase-3 and -7 activation. As shown in Figure 2F, ECs overexpressing N2ICD exhibited a strong caspase activity as compared to AdGFP and AdNull controls (40.9 fold and 93.4 fold increase, respectively).

Protective effect of the pan caspase inhibitor Z-VAD-FMK in AdN2ICD-transduced ECs further confirmed that Notch2 mediates EC death by inducing caspase-mediated apoptosis (supplemental Figure S2).

In vascular ECs, TNF promotes EC activation/dysfunction but low levels of apoptosis, notably by inducing protective signaling pathways. To test the relevance of Notch2 induction and its pro-apoptotic function in ECs, we test its regulation in a TNF-related apoptosis model. First, we showed in Figure 3A that EC apoptosis can be triggered by using the combination of TNF and the antioxidant pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC), also commonly used as a non specific NFκB inhibitor. Interestingly, as TNF fail to

induce EC apoptosis and correlates with a transient Notch2 activation after 6 h of treatment, the apoptotic combination of TNF and PDTC was associated with a stronger and sustained activation of Notch2 receptor between 2 h and 24 h of treatment (Figure 3B) thus confirming the implication of Notch2 signaling in EC apoptosis process.

Altogether, these results suggest that a major consequence of Notch2 activation in vascular ECs is the induction of apoptosis in a time- and dose-dependent manner.

Activated Notch2 Broadly Represses the Transcription of Apoptosis Mediators

To examine the underlying mechanisms by which Notch2 NICD sensitizes ECs to apoptosis, an apoptosis-dedicated qRT-PCR array displaying 88 pro- and anti-apoptotic molecules was used. Fold changes in gene expression between AdN2ICD- and AdGFP-transduced ECs are depicted in the Figure 4A, as well as TNF-treated *versus* non-treated ECs as control. 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 N2ICD. We found that 5 out of 7 regulated genes were the pro-apoptotic molecules Bim, death-associated protein kinase 2 DAPK2, HRK (Harakiri) and DR5 (a TRAIL receptor) and CD40 whose expression was highly repressed in response to N2ICD (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 N2ICD significantly decreases gene transcript levels for 2 protective 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 qRT-PCR and found correlated to Notch2 expression (Figure 4B).

Since we found that constitutive expression of N2ICD in cultured ECs elicits apoptosis but also impairs EC proliferation (supplemental Figure S3), we speculate that survivin, a potent regulator of both functions, notably in ECs, also found inhibited by TNF, could be a key player of Notch2 signaling [20,21]. Therefore, we further examined the possible involvement of survivin in Notch2-mediated apoptosis. First, Figure 4C confirms that N2ICD 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 dependent on N2ICD in ECs. Our results suggest therefore that Notch2 activation could mediate EC apoptosis by negatively regulating the key protective *survivin* gene (Figure 4D).

Notch2 Silencing by RNA Interference Promotes Survivin Expression and Rescues ECs from Apoptosis

Based on the above results, we further investigated the possible crosstalk between apoptotic pathway and Notch2 signaling in ECs. Because many genetic studies showed 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, ECs were transfected with specific Notch2 targeted siRNAs. Non targeting scramble siRNAs were used as controls. Among the 3 tested siRNAs, 2 displayed a significant down-regulation of Notch2, at mRNA level by qRT-PCR ($71.2 \pm 3.4\%$ and $78.6 \pm 6.1\%$ of inhibition for siN2#1 and #2, respectively, as compared to control siRNA) (Figure 5A). Figure 5B demonstrates that, in

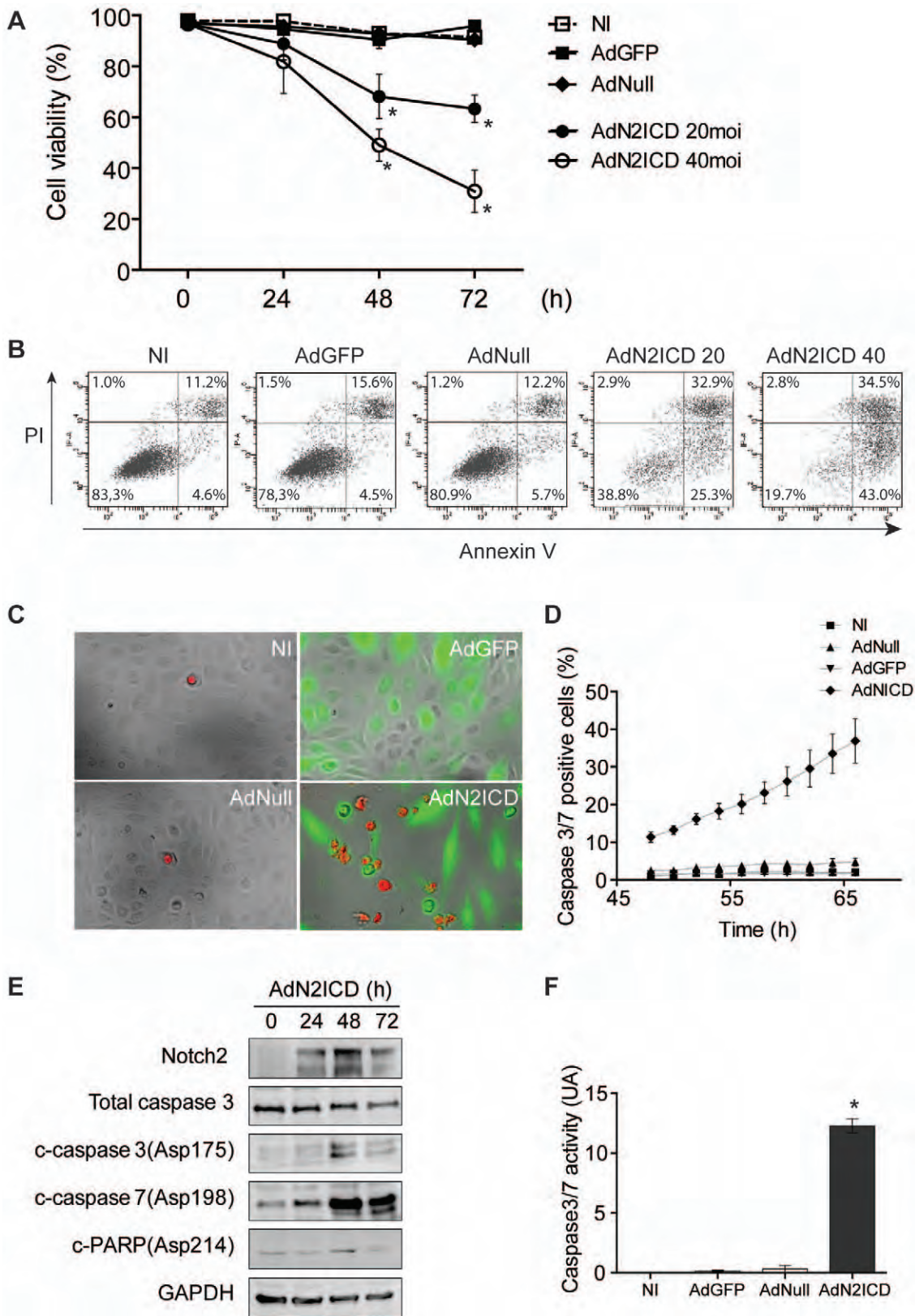


Figure 2. Notch2 activation elicits EC apoptosis. (A) Quantification of EC viability 0–72 h post-infection with AdGFP, AdNull or AdN2ICD using a DNA content assay. (B) Apoptosis detection 72 h post-transduction after AnnexinV and Propidium Iodide (PI) staining. (C) PhiPhiLux™ system to detect real-time activation of caspase3/7 in live ECs after 48 h post-infection for 18 hours, A representative image after imaging is shown in panel C. Caspase3/7 positive cells/field (in %) were counted every 2 hours during the experiment (D). A western blot analysis for cleaved-forms of caspase-3, -7 and PARP in response to Notch2 NICD (E). (F) A colorimetric assay for caspase 3 and 7 activation 48 h after transduction. doi:10.1371/journal.pone.0008244.g002

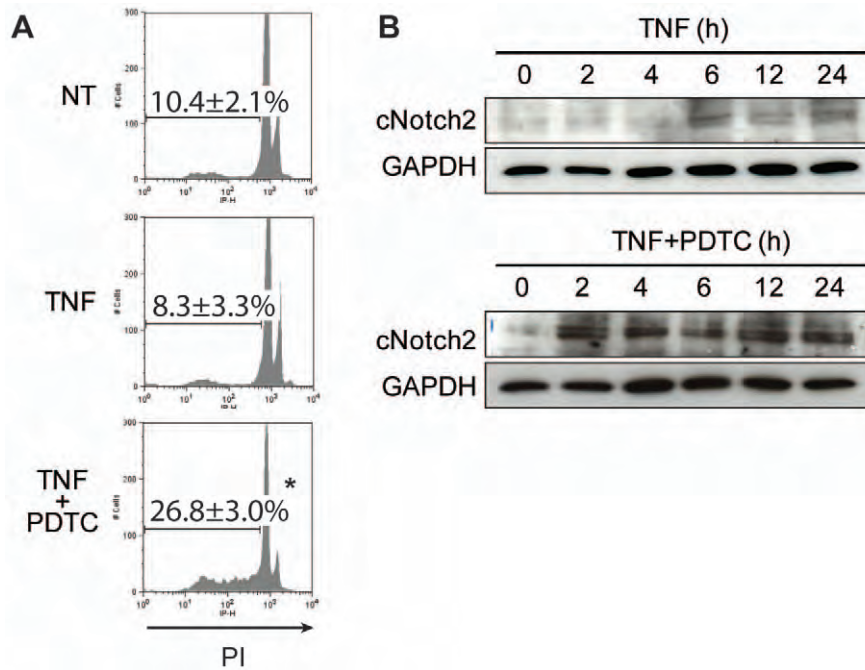


Figure 3. TNF and PDTTC treatment induces EC mortality. EC death induction by DNA content assay (**A**) and activated cleaved-Notch2 expression by Western Blot (**B**) after TNF and PDTTC treatment. Results are representative of 3 independent experiments. * $p < 0.05$ versus controls. doi:10.1371/journal.pone.0008244.g003

contrast to N2ICD that inhibited survivin expression, Notch2 silencing significantly increases survivin mRNA in vascular ECs (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 from apoptosis, ECs were cultured for 48 h after siRNA transfection before induction of apoptosis by TNF and PDTTC treatment (supplemental Figure S4). Cell death was then quantified by DNA content analysis (Figure 5D). First, we observed that knockdown of Notch2 did not modify basal EC viability. Moreover, when EC apoptosis is induced by a 24 h treatment with TNF and PDTTC, Notch2 knockdown significantly rescued ECs from apoptosis as compared to scramble control.

Altogether, these findings suggest that survivin regulation is controlled at the Notch level and that Notch2 inhibition protects ECs from apoptosis by increasing survivin expression level.

Notch2-Mediated Endothelial Apoptosis Is Dependent on Survivin Down-Regulation

To validate the direct implication of survivin in Notch2-mediated apoptotic functions, we transfected ECs with survivin, XIAP (a close member of the survivin IAP family) or Bcl2 cDNA before N2ICD overexpression. Considering a transfection efficiency of 40% in HUVEC with plasmids, ectopic expression of survivin very efficiently prevents cell apoptosis mediated by N2ICD ($29.5 \pm 4.1\%$ *versus* $47.3 \pm 6.5\%$ of cell death for Null control). In contrast, no protective effect was observed with XIAP nor Bcl2, attesting the specific involvement of survivin in Notch2-mediated apoptosis in ECs (Figure 6A–B). Because survivin may directly bind and inhibit caspases, we tested by western blotting whether survivin decrease in response to Notch2 activation was implicated in N2ICD-dependent caspase activation. As shown in Figure 6C, ectopic expression of survivin in N2ICD overexpressing ECs was sufficient to significantly reduce N2ICD-mediated

caspace 7 activation. These results therefore suggest that N2ICD triggers caspase-dependent apoptosis by decreasing survivin anti-caspase activity.

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 leads to a rapid decrease in survivin mRNA and protein expression, and survivin upregulation was obtained by the selective knockdown of Notch2 in ECs, indicating that survivin regulation is controlled at the Notch level.

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. The major vascular defects observed in Notch1^{-/-}, exacerbated in Notch1^{-/-} Notch4^{-/-} mutant animals and the restricted expression of Notch4 in ECs led studies to focus on these Notch receptors in ECs. Notch1 and Notch4 seems to share common major functions in angiogenesis as both protect ECs from apoptosis and decrease growth rate [9,22,23,24,25,26]. These findings also illustrate possible compensatory mechanisms in Notch4^{-/-} mice by Notch1 which do not develop severe vascular defects.

Nonetheless, little is known about Notch2 implication in vascular homeostasis. We show here that Notch2 exerts opposite effects on EC survival as compared to Notch1 and Notch4. This pro-apoptotic function has already been reported in breast and skin cancers [27,28]. However, controversial results in various cancer models seem to point out cell-type or cellular context specific orientation of Notch2 apoptotic function [29,30,31,32].

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

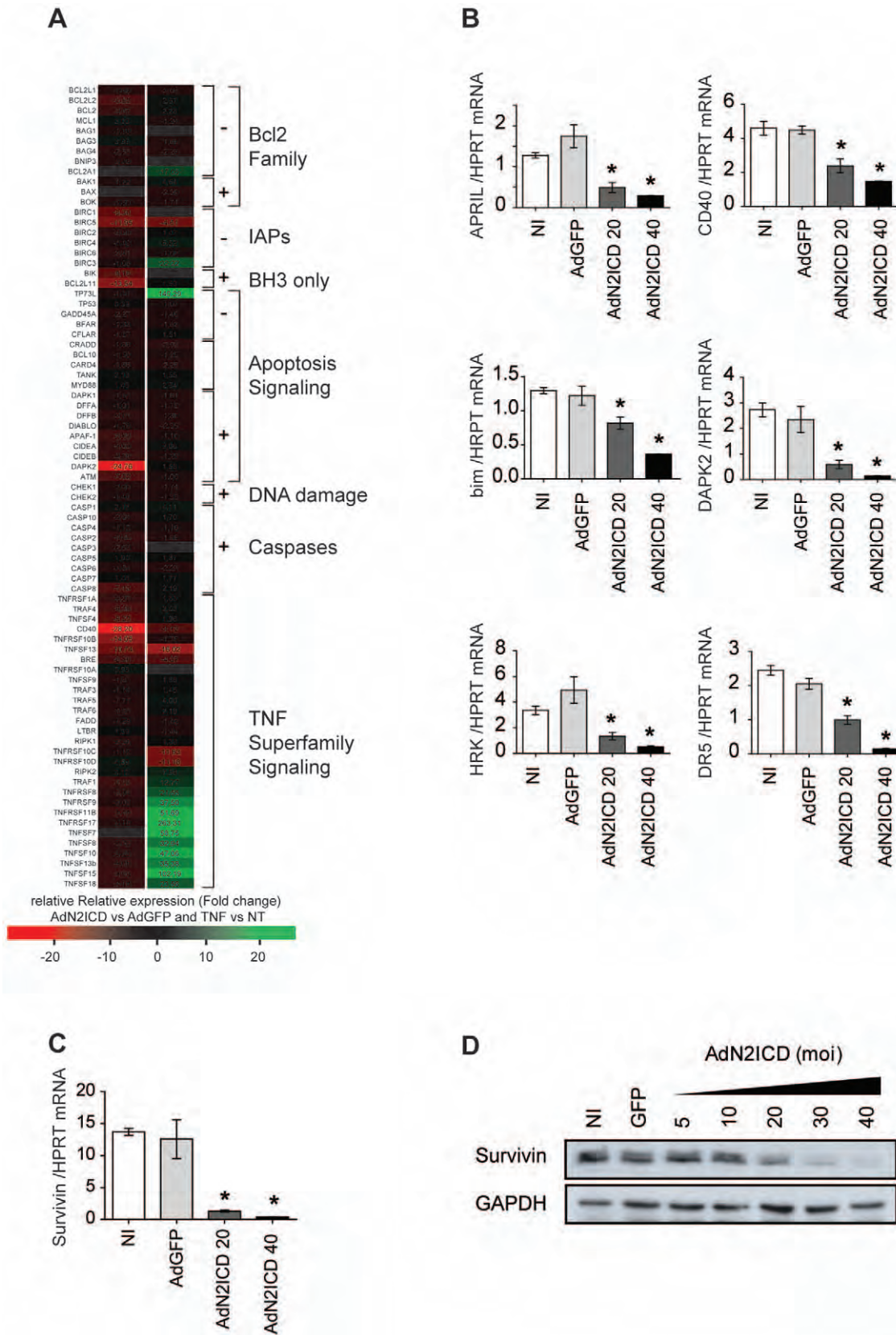


Figure 4. Notch2 signaling downregulates apoptosis mediators. (A) A schematic representation of apoptosis-related transcripts repressed (red) or induced (green) by N2ICD or TNF determined by a dedicated PCR array. Means are shown as fold changes compared to AdGFP or untreated ECs, respectively. (B) Validation of transcripts regulation by qRT-PCR in ECs transduced with AdN2ICD (moi 20 and 40) in comparison to controls (non infected (NI) and AdGFP) (B–C). (D) Dose-response effect of AdN2ICD on Survivin protein expression by western blot. Results are representative of 5 independent experiments. * $p < 0.05$ versus controls. doi:10.1371/journal.pone.0008244.g004

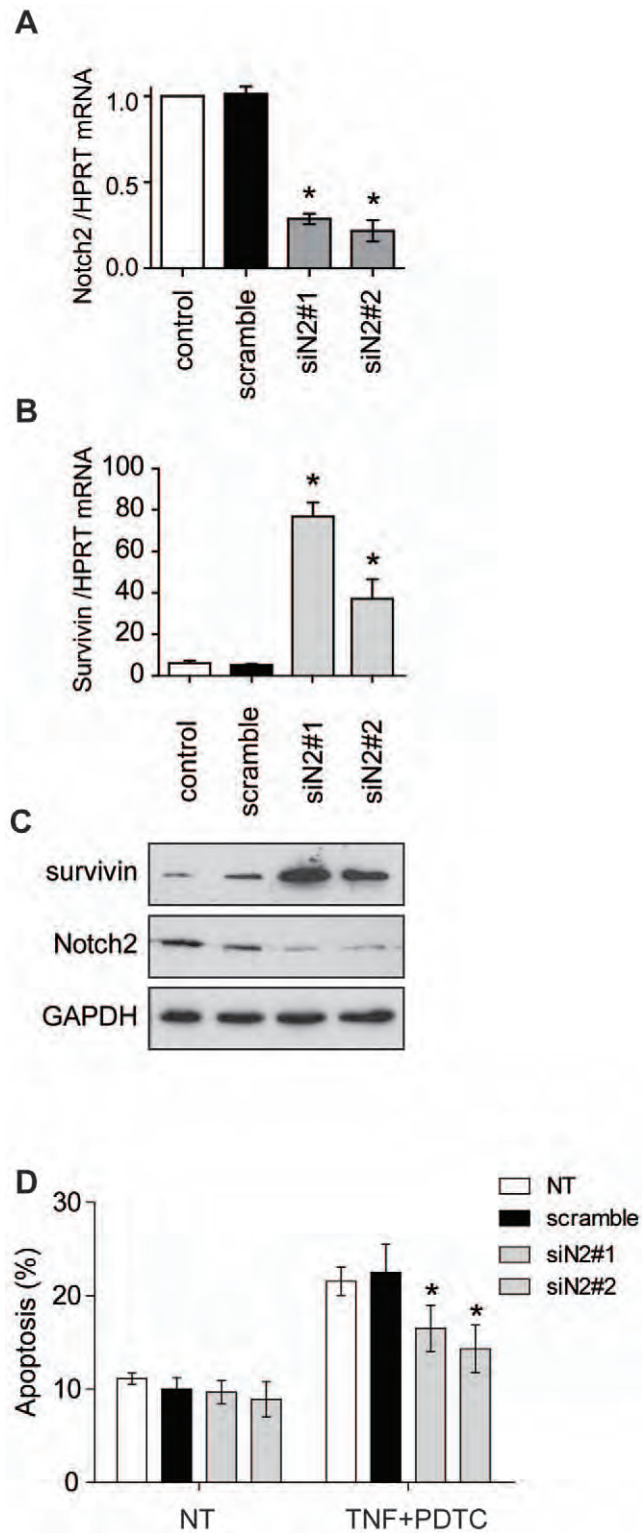


Figure 5. Notch2 knockdown increases survivin and rescues ECs from apoptosis. (A) Validation of Notch2 silencing in ECs by qRT-PCR. (B) qRT-PCR for survivin mRNA in ECs transfected with a scramble siRNA or siRNAs targeting Notch2. (C) Survivin and Notch2 expression by western blot. (D) DNA content analysis of siRNA transfected ECs after induction of apoptosis by TNF and PDTC (NT: non transfected cells). Results are means \pm SEM of 3 independent experiments.* p <0.05 versus scramble.

doi:10.1371/journal.pone.0008244.g005

the genetic mouse models in which Notch1 deficiency results in impaired T-cell development [33], while Notch2 deficiency causes a dramatic absence of MZB cells [34]. Accordingly, a recent study demonstrates that activation of different Notch receptors in the human mammary adenocarcinoma cell line MDA-MB-231 drives dramatically opposing effects, leading to either increased apoptosis in the case of Notch2 or increased proliferation in the case of Notch4 [35]. This is also in line with the finding that different Notch ICDs have different target sequence selectivity [36]

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 study [13] and results presented here indicate that TNF elicits a drastic change in the pattern of Notch receptors expressed on vascular ECs. This change corresponds to phenotypic switch where Notch4 is replaced by Notch2. No significant change in Notch1 protein was observed. Among Notch ligands, only DLL1 was found to be upregulated by inflammatory cytokines (data not shown), providing a potential mechanism for Notch2 activation in response to TNF. Functionally, activation of Notch2 signaling favors cell death while Notch4 activation was shown to be protective [9]. Thus it is tempting to speculate that cytokines (i.e. TNF) 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 Notch2 [37]. 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 conditions [19]. Survivin is an inhibitor of apoptosis protein (IAP) that is upregulated in cancer and has recently been implicated in vascular injury [38]. 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 lethality [39]. 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 survival [40]. Although the existence of functional survivin-caspase complexes is controversial, the ability of survivin to inhibit apoptosis has been clearly demonstrated [41]. Expression of survivin protects normal or transformed cells from apoptosis [42] while forced expression of survivin inhibits various forms of cell death both *in vitro* and *in vivo* [39]. Lack of endothelial cell survivin resulted in embryonic lethality. Mutant embryos had prominent and diffuse haemorrhages from embryonic day 9.5 (E9.5) and died before E13.5 [43], pointing out a key protective role of survivin in ECs. Our findings are complementary to studies in primary cultured human ECs and VSMCs where induction of apoptosis by TNF and cycloheximide or inflammatory cytokines (IFN γ , TNF, IL1 β) was completely prevented by survivin overexpression [21,44]. Moreover, whether survivin inhibition by Notch2 could be implicated in proliferation blockade resulting from Notch2 induction remains to be verified. Nonetheless, survivin may act upstream of gene expression and directly influence the transcription of pivotal growth-related gene(s) in vascular cells. In the

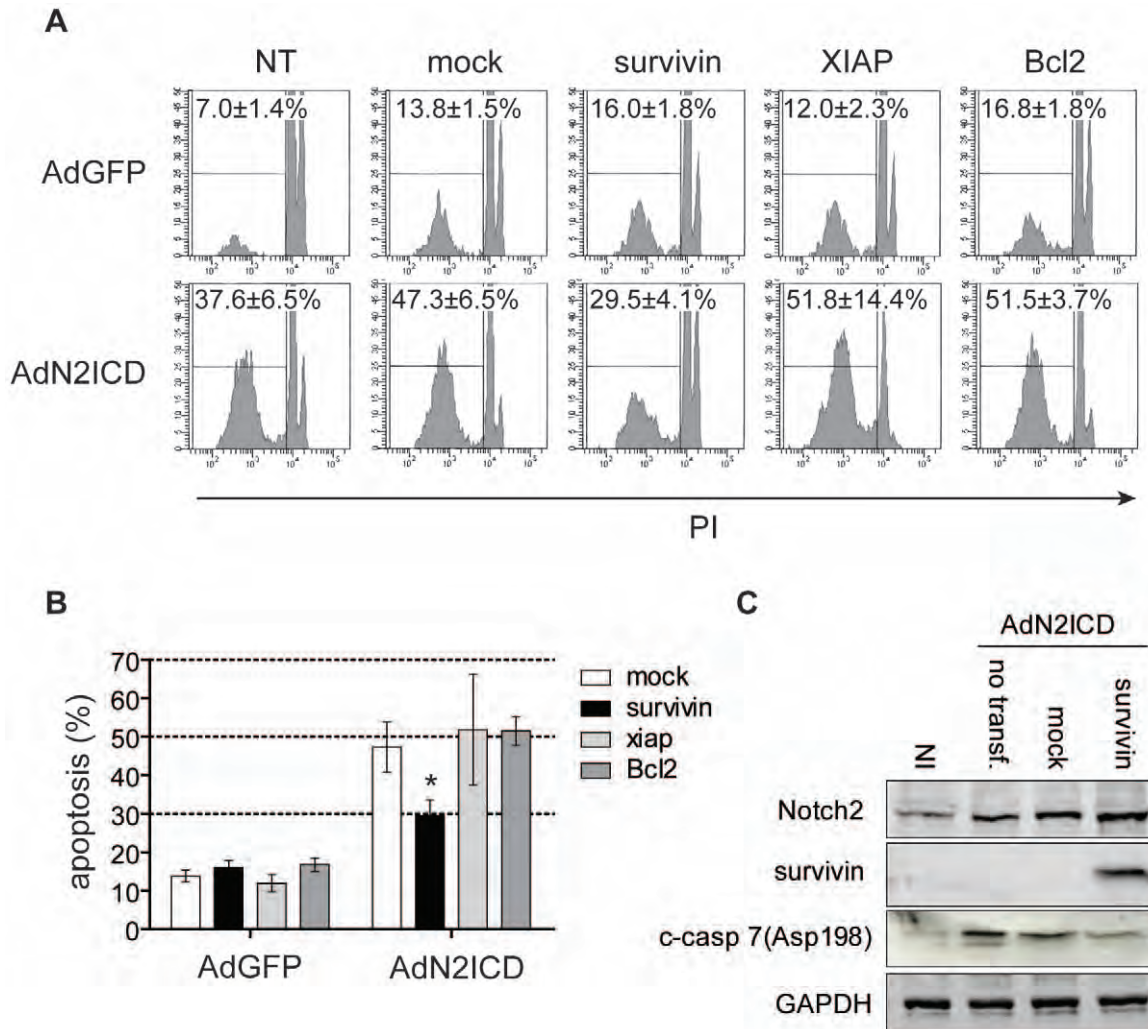


Figure 6. Survivin prevents Notch2-mediated apoptosis. ECs were transduced or not (NT) with AdGFP (5 moi) or AdN2ICD (30 moi) after transfection with a plasmid encoding survivin, XIAP or Bcl2 full cDNAs or the empty vector (mock) as a control. Cell death was measured by DNA content (A). Corresponding means \pm SEM of 7 independent experiments (B). * $p < 0.05$ versus mock. A representative western blotting analysis for Notch2, survivin and cleaved-caspase 7 expression in ECs non infected (NI) or transduced with AdN2ICD (30 moi) 24 h prior to transfection with mock or survivin plasmids. Cell lysates were collected 48 h after infection (representative of 3 independent experiments). doi:10.1371/journal.pone.0008244.g006

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 show for the first time that TNF signaling strongly upregulates and activates Notch2 in vascular ECs. Our findings further indicate that dysregulated Notch2 signaling sensitizes vascular ECs to apoptosis and demonstrate a major role for survivin as effector of Notch signaling.

Supporting Information

Figure S1 Activation of Notch2 signaling in ECs. (A) Dose-dependent transduction of ECs according to moi for the recombinant AdGFP and AdN2ICD. Results are expressed as percentage of GFP-expressing cells determined by flow cytometry 24h post-infection. (B) GFP expression analysis by fluorescence microscopy in ECs transduced with AdGFP or AdN2ICD. (C) Western blot for Notch2 and GAPDH expression. Non-infected (NI) and ECs infected with AdGFP are used as controls. (D)

Immunoreactivity for N2ICD correlated to GFP expression in nuclei of ECs transduced with AdN2ICD. (E) Cotransfection of ECs with a CBF1/luciferase reporter plasmid and a plasmid encoding N2ICD. Controls included non transfected ECs (NT), CBF1/luc-transfected cells treated with medium or DAPT. Results are means of 4 independent experiments (arbitrary units). Found at: doi:10.1371/journal.pone.0008244.s001 (3.78 MB TIF)

Figure S2 AdN2ICD-mediated apoptosis protection by caspase inhibition. Non infected (NI), AdGFP and AdN2ICD-transduced HAECs were cultured with or without the pan caspase inhibitor zvad for 48h. Cell death was measured by DNA content assay. Results are representative of 3 independent experiments. Found at: doi:10.1371/journal.pone.0008244.s002 (1.39 MB TIF)

Figure S3 Notch2 inhibits EC proliferation in response to FGF. Transduced ECs by AdN2ICD (moi 20 and 40) or AdGFP control vector (moi 5) proliferation in response to FGF was tested by tritiated-thymidine uptake. Results are means \pm SEM from 3 independent experiments. * $p < 0.05$ vs AdGFP control.

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0008244.s003 (0.68 MB TIF)

Figure S4 Induction of EC apoptosis by TNF and PDTC treatment. ECs were treated with TNF and PDTC for 24 h (NT: non treated cells). Apoptosis was quantified by flow cytometry after Annexin V and Propidium Iodide (PI) labeling. A representative dot plot (A) and graphic representation (B) are shown. Results are means \pm SEM from 3 independent experiments. * $p < 0.05$ vs untreated cells.

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0008244.s004 (1.01 MB TIF)

References

- Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ (1999) Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* 284: 770–776.
- Iso T, Kedes L, Hamamori Y (2003) HES and HERP families: multiple effectors of the Notch signaling pathway. *J Cell Physiol* 194: 237–255.
- Uyttendaele H, Marazzi G, Wu G, Yan Q, Sassoon D, et al. (1996) Notch4/int-3, a mammary proto-oncogene, is an endothelial cell-specific mammalian Notch gene. *Development (Cambridge, England)* 122: 2251–2259.
- Villa N, Walker L, Lindsell CE, Gasson J, Iruela-Arispe ML, et al. (2001) Vascular expression of Notch pathway receptors and ligands is restricted to arterial vessels. *Mech Dev* 108: 161–164.
- Iso T, Hamamori Y, Kedes L (2003) Notch signaling in vascular development. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23: 543–553.
- Gridley T (2007) Vascular biology: vessel guidance. *Nature* 445: 722–723.
- Krebs LT, Xue Y, Norton CR, Shutter JR, Maguire M, et al. (2000) Notch signaling is essential for vascular morphogenesis in mice. *Genes Dev* 14: 1343–1352.
- Uyttendaele H, Ho J, Rossant J, Kitajewski J (2001) Vascular patterning defects associated with expression of activated Notch4 in embryonic endothelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 5643–5648.
- MacKenzie F, Duriez P, Wong F, Nosedá M, Karsan A (2004) Notch4 Inhibits Endothelial Apoptosis via RBP-J $\{\kappa\}$ -dependent and -independent Pathways. *J Biol Chem* 279: 11657–11663.
- Nosedá M, Chang L, McLean G, Grim JE, Clurman BE, et al. (2004) Notch activation induces endothelial cell cycle arrest and participates in contact inhibition: role of p21Cip1 repression. *Mol Cell Biol* 24: 8813–8822.
- Pober JS (2002) Endothelial activation: intracellular signaling pathways. *Arthritis Res* 4 Suppl 3: S109–116.
- Bach FH, Hancock WW, Ferran C (1997) Protective genes expressed in endothelial cells: a regulatory response to injury. *Immunol Today* 18: 483–486.
- Quillard T, Coupel S, Coulon F, Fitau J, Chatelais M, et al. (2008) Impaired Notch4 activity elicits endothelial cell activation and apoptosis: implication for transplant arteriosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28: 2258–2265.
- Coupel S, Leboeuf F, Boudlay G, Soullillou JP, Charreau B (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: 2429–2439.
- Shawber C, Nofziger D, Hsieh JJ, Lindsell C, Bogler O, et al. (1996) Notch signaling inhibits muscle cell differentiation through a CBF1-independent pathway. *Development* 122: 3765–3773.
- Witt CM, Hurez V, Swindle CS, Hamada Y, Klug CA (2003) Activated Notch2 potentiates CD8 lineage maturation and promotes the selective development of B1 B cells. *Mol Cell Biol* 23: 8637–8650.
- Fitau J, Boudlay G, Coulon F, Quillard T, Charreau B (2006) The adaptor molecule LNK negatively regulates TNF α -dependent VCAM-1 expression in endothelial cells through inhibition of the ERK1 and 2 pathways. *J Biol Chem*.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2 $\{-\Delta\Delta C_T\}$ Method. *Methods* 25: 402–408.
- Cailhier JF, Laplante P, Hebert MJ (2006) Endothelial apoptosis and chronic transplant vasculopathy: recent results, novel mechanisms. *Am J Transplant* 6: 247–253.
- Altieri DC (2008) Survivin, cancer networks and pathway-directed drug discovery. *Nat Rev Cancer* 8: 61–70.
- O'Connor DS, Schechner JS, Adida C, Mesri M, Rothermel AL, et al. (2000) Control of apoptosis during angiogenesis by survivin expression in endothelial cells. *Am J Pathol* 156: 393–398.
- Sade H, Krishna S, Sarin A (2004) The anti-apoptotic effect of Notch-1 requires p56lck-dependent, Akt/PKB-mediated signaling in T cells. *J Biol Chem* 279: 2937–2944.
- Liu ZJ, Xiao M, Balint K, Soma A, Pinnix CC, 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: 1009–1011.
- Takeshita K, Satoh M, Ii M, Silver M, Limbourg FP, et al. (2007) Critical role of endothelial Notch1 signaling in postnatal angiogenesis. *Circ Res* 100: 70–78.
- Leong KG, Hu X, Li L, Nosedá M, Larrivee B, et al. (2002) Activated Notch4 inhibits angiogenesis: role of beta 1-integrin activation. *Mol Cell Biol* 22: 2830–2841.
- MacKenzie F, Duriez P, Larrivee B, Chang L, Pollet I, et al. (2004) Notch4-induced inhibition of endothelial sprouting requires the ankyrin repeats and involves signaling through RBP-J κ . *Blood* 104: 1760–1768.
- Parr C, Watkins G, Jiang WG (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: 779–786.
- O'Neill CF, Urs S, Cinelli C, Lincoln A, Nadeau RJ, et al. (2001) Notch2 signaling induces apoptosis and inhibits human MDA-MB-231 xenograft growth. *The American Journal of Pathology* 171: 1023–1036.
- Hubmann R, Schwarzmeier JD, Shehata M, Hilgath M, Duechler M, et al. (2002) Notch2 is involved in the overexpression of CD23 in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 99: 3742–3747.
- Fan X, Mikolaenko I, Elhassan I, Ni X, Wang Y, et al. (2004) Notch1 and Notch2 have opposite effects on embryonal brain tumor growth. *Cancer Res* 64: 7787–7793.
- Boulay JL, Miserez AR, Zweifel C, Sivasankaran B, Kana V, et al. (2007) Loss of NOTCH2 positively predicts survival in subgroups of human glial brain tumors. *PLoS ONE* 2: e576.
- Florena AM, Tripodo C, Guarnotta C, Ingrao S, Porcasi R, 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: 317–322.
- Radtke F, Raj K (2003) The role of Notch in tumorigenesis: oncogene or tumour suppressor? *Nat Rev Cancer* 3: 756–767.
- Saito T, Chiba S, Ichikawa M, Kunisato A, Asai T, et al. (2003) Notch2 is preferentially expressed in mature B cells and indispensable for marginal zone B lineage development. *Immunity* 18: 675–685.
- O'Neill CF, Urs S, Cinelli C, Lincoln A, Nadeau RJ, et al. (2007) Notch2 signaling induces apoptosis and inhibits human MDA-MB-231 xenograft growth. *Am J Pathol* 171: 1023–1036.
- Ong CT, Cheng HT, Chang LW, Ohtsuka T, Kageyama R, et al. (2006) Target selectivity of vertebrate notch proteins. Collaboration between discrete domains and CSL-binding site architecture determines activation probability. *J Biol Chem* 281: 5106–5119.
- Wu L, Maillard I, Nakamura M, Pear WS, Griffin JD (2007) The transcriptional coactivator Maml1 is required for Notch2-mediated marginal zone B-cell development. *Blood* 110: 3618–3623.
- Blanc-Brude OP, Yu J, Simosa H, Conte MS, Sessa WC, et al. (2002) Inhibitor of apoptosis protein survivin regulates vascular injury. *Nat Med* 8: 987–994.
- Altieri DC (2003) Survivin, versatile modulation of cell division and apoptosis in cancer. *Oncogene* 22: 8581–8589.
- Kirkiles-Smith NC, Mahboubi K, Plescia J, McNiff JM, Karras J, et al. (2004) IL-11 protects human microvascular endothelium from alloinjury in vivo by induction of survivin expression. *J Immunol* 172: 1391–1396.
- Romagnoli M, Trichet V, David C, Clement M, Moreau P, et al. (2007) Significant impact of survivin on myeloma cell growth. *Leukemia* 21: 1070–1078.
- Altieri DC (2006) Targeted therapy by disabling crossroad signaling networks: the survivin paradigm. *Mol Cancer Ther* 5: 478–482.
- Zwerfs F, Lupu F, De Vriese A, Pollefeys S, Moons L, et al. (2007) Lack of endothelial cell survivin causes embryonic defects in angiogenesis, cardiogenesis, and neural tube closure. *Blood* 109: 4742–4752.
- Wang GJ, Sui XX, Simosa HF, Jain MK, Altieri DC, et al. (2005) Regulation of vein graft hyperplasia by survivin, an inhibitor of apoptosis protein. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25: 2081–2087.

Acknowledgments

The authors thank Philippe Hulin and the “confocal microscopy and cellular imaging platform” of IFR26 for time lapse study. We thank the vector core of the University Hospital of Nantes supported by the Association Française contre les Myopathies (AFM) for providing the adenoviral vectors.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: TQ BC. Performed the experiments: TQ JD MC FC. Analyzed the data: TQ BC. Contributed reagents/materials/analysis tools: CS MR SBN. Wrote the paper: TQ BC.

Discussion et Perspectives

Discussion et Perspectives

Importance de Lnk dans le contrôle de la voie de signalisation des intégrines

Dans cette étude, nous avons établi un lien entre la protéine adaptatrice Lnk (SH2B3) et la voie de signalisation des intégrines. Nos résultats sont en accord avec les récentes observations de Takizawa *et al.*, dont les travaux *in vivo* réalisés chez la souris ont démontré la participation de Lnk dans la signalisation *outside-in* de l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ des plaquettes (Takizawa *et al.*, 2010). Cette équipe a constaté que la suppression de Lnk dans les plaquettes est à l'origine d'une diminution de la phosphorylation de la sous-unité β3 et de la liaison de Fyn à l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$. Ce défaut d'activation de l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ induit l'inhibition de l'étalement des plaquettes $\text{Lnk}^{-/-}$ sur le fibrinogène, conduisant à une instabilité du thrombus sanguin. Nous avons montré une régulation similaire dans les CE vasculaires. Pour ce faire, la sous-unité β1 des intégrines a été activée par l'incubation d'un anticorps activateur anti-CD29 avec les CE, et l'engagement de la voie de l'intégrine a été contrôlé par la phosphorylation des kinases Akt et GSK3 β . Ce modèle d'activation a été validé sur des CE de souris WT et a montré une activation spécifique de l'intégrine β1 induite par l'anticorps anti-CD29, qui est attestée par la phosphorylation des deux kinases. En revanche, nous avons observé dans les mêmes conditions que la délétion de *Lnk* dans les CE de souris inhibe la phosphorylation d'Akt et de GSK3 β . Ce résultat montre indirectement que la transduction des signaux *outside-in* des intégrines à chaîne β1 requiert la présence de la protéine adaptatrice Lnk dans les CE. Cette donnée est confortée par la phosphorylation rapide de Lnk lors de l'activation de la sous-unité β1 des intégrines qui suggère son implication dans cette voie de signalisation. Si la perte de Lnk inhibe l'étalement cellulaire des plaquettes (Takizawa *et al.*, 2010), nous avons observé qu'inversement sa surexpression s'accompagne d'une augmentation de la vitesse d'adhésion et du nombre d'adhésions focales dans les CE.

Rôle potentiel de Lnk dans la formation des adhésions focales

L'activation des intégrines est suivie de l'assemblage des complexes focaux et de leur maturation en adhésions focales. Le processus de formation des points d'adhésions consiste en un recrutement séquentiel des protéines de structure et de signalisation au niveau de la

chaîne β des intégrines. Le regroupement en clusters des intégrines est rapidement suivi par la liaison de la taline à la sous-unité β . L'augmentation de la production de PIP2 par l'enzyme PIPK1 γ , activée par la taline, facilite la formation des points d'adhésion en créant de nouveaux sites de liaison pour d'autres protéines (Di Paolo et al., 2002). Ainsi, la vinculine, présente sous forme inactive, se lie au lipide PIP2. Cette interaction entraîne le déploiement de la protéine vinculine et l'exposition de ses domaines de liaison à la taline, l' α -actinine et VASP (Gilmore et Burridge, 1996). La fixation de la vinculine au point d'adhésion naissant, est rapidement suivie par le recrutement de la paxilline et de la kinase FAK qui renforcent le lien des intégrines aux filaments d'actine. L'autophosphorylation de FAK sur la tyrosine 397 crée un motif reconnu par plusieurs protéines possédant un domaine SH2, comme Src, la phospholipase C γ , Grb7, Shc, p120RasGAP et la sous-unité p85 de la PI3K (Chen et Guan, 1994) (Xing et al., 1994) (Zhang et al., 1999) (Hanks et al., 2003) (Mitra et al., 2005). L'activation des deux enzymes FAK et Src permet de constituer des sites de recrutement pour des protéines additionnelles conduisant à la formation d'un complexe multiprotéique de plus en plus important (Parsons, 2003). Dans les CE, la phosphorylation des résidus tyrosine des protéines intracellulaires peut être induite par le regroupement des intégrines (Miyamoto et al., 1995), la stimulation par des facteurs de croissance (Rankin et Rozengurt, 1994) ou l'application de forces de tension (Yano et al., 1996). L'importance des phosphorylations protéiques est confirmée par l'emploi d'inhibiteurs de la phosphorylation des tyrosines qui bloquent l'assemblage des AF et le recrutement de nombreux composants des sites d'adhésion (Burridge et al., 1992).

La formation des points d'adhésion est donc un enchaînement d'étapes permettant le recrutement successif de diverses molécules, dont l'association est régulée par l'affinité des composants et leurs interactions spécifiques. Les protéines adaptatrices participent largement à ce phénomène notamment en favorisant les interactions moléculaires. Nos travaux ont montré que la surexpression de Lnk induit une forte augmentation du nombre d'adhésions focales dans les CE. De plus, nous avons observé une induction de la phosphorylation de FAK et de la paxilline, et plus généralement une augmentation du nombre de protéines tyrosine phosphorylée. Ces résultats suggèrent une stimulation de la dynamique de formation des AF par Lnk. Toutefois, le mécanisme par lequel Lnk favorise l'assemblage des adhésions focales reste à définir. Une hypothèse serait que la formation du complexe ILK-Lnk favoriserait l'activité d'ILK qui, en retour, activerait la voie *inside-out* des

intégrines. Cette stimulation aurait pour conséquence l'augmentation des clusters d'intégrines, et l'activation des cascades de phosphorylation conduisant au regroupement des protéines des adhésions en complexes.

Cependant, si l'augmentation du nombre d'AF peut être consécutive à une formation accrue des sites d'adhésion, elle peut également découler d'une accumulation d'AF en raison d'une inhibition du désassemblage de ces structures.

Rôle potentiel de Lnk dans la dissociation des adhésions focales

Tout comme l'assemblage des AF, leur dissociation est un processus hautement régulé. La migration cellulaire nécessite l'engagement des intégrines ainsi que l'initiation de cycles comprenant la protrusion de la membrane cellulaire, la formation de nouveaux points d'adhésions et la rétraction de la partie postérieure de la cellule. L'extension du lamellipode nécessite le turnover des AF, c'est-à-dire la dissociation des sites d'adhésion situés à la base du lamellipode et leur reformation en bordure du lamellipode (Laukaitis et al., 2001). De même, la rétraction du corps cellulaire exige le désassemblage des points d'adhésion situés à l'arrière de la cellule. L'observation par vidéomicroscopie de protéines de fusion fluorescentes a permis de comprendre la cinétique du désassemblage des AF. Contrairement à la formation des AF, la dissociation des protéines paxilline, FAK, zyxine n'est pas séquentielle mais concomitante (Webb et al., 2004). Cependant, les mécanismes de dissociation des complexes liés aux intégrines ne sont actuellement pas complètement élucidés. Ils semblent être contrôlés par plusieurs voies de signalisation et par la modulation des forces de tension (Broussard et al., 2008) (Schober et al., 2007).

FAK apparaît être un régulateur clé de la dissolution des AF par le biais des protéines ERK (p42-44 MAPK) et MLCK (Webb et al., 2004). FAK déstabilise les AF par la phosphorylation de Src et de p190RhoGAP, qui diminue l'activité de Rho et de ROCK. De plus, le recrutement simultané d'un complexe formé par le facteur d'échange PIX et l'effecteur PAK des Rho GTPases Rac1 et Cdc42, diminue les fibres de stress et les tensions générées par la myosine (Schober et al., 2007). Le relâchement de la tension cellulaire favoriserait le désassemblage des sites d'adhésion. Cette observation est en accord avec les études impliquant la contractilité de la myosine dans la formation des adhésions précoces (Rottner et al., 1999) (Gupton et Waterman-Storer, 2006). De plus, FAK pourrait activer la

protéase calpaïne, connue pour déstabiliser les AF par le clivage de plusieurs protéines, comme la paxilline, la vinculine et la taline (Franco et Huttenlocher, 2005).

Les études de délétion génétique confirment le rôle prépondérant de FAK dans la dissociation des adhésions : les fibroblastes FAK^{-/-} présentent des points d'adhésion plus larges et plus stables ainsi qu'une diminution de la migration cellulaire (Ilić et al., 1995). Cependant, le mécanisme complexe de la dynamique des adhésions est régulé par l'expression de FAK mais également par sa phosphorylation. En effet, si la suppression de FAK provoque une accumulation des AF, il en est de même de son hyperphosphorylation.

La tyrosine phosphatase SHP2 affecte la fonction des intégrines notamment en régulant la phosphorylation de FAK. Il a été montré que l'inhibition de l'activité de SHP2 entraîne l'hyperphosphorylation de FAK, mais aussi une augmentation du nombre des AF résultant d'un défaut de la maturation des sites d'adhésion (Yu et al., 1998) (von Wichert et al., 2003) (Mañes et al., 1999).

Dans notre modèle, nous avons observé que Lnk augmente fortement la phosphorylation de FAK. Cette hyperphosphorylation pourrait être à l'origine d'une accumulation de points d'adhésion immatures dans la cellule. Cette hypothèse pourrait être vérifiée par la réalisation de marquages immunohistochimiques de protéines spécifiques des sites d'adhésion matures, comme l' α -actinine ou la zyxine. L'inhibition de la phosphorylation de FAK dans des CE infectées par l'adénovirus Lnk, pourrait être envisagée par la transfection d'un mutant de FAK non phosphorylable. L'utilisation de ce dominant négatif serait suivie de la quantification du nombre d'adhésions focales par cellule.

De même, la phosphorylation de la paxilline module la dynamique d'adhésion. La paxilline non phosphorylée est essentielle à la formation des adhésions fibrillaires. En revanche, sa forme phosphorylée au niveau des tyrosines (Y31 et Y118) régule la naissance des adhésions précoces et induit le turnover des sites d'adhésion. Ainsi, la phosphorylation de la paxilline affecte l'adhésion par deux actions distinctes et contradictoires: d'un côté en stimulant l'assemblage des adhésions précoces, de l'autre en induisant leur turnover et donc leur dissociation. Zaidel-Bar *et al.* proposent un modèle dans lequel les forces mécaniques régulent la phosphorylation de la paxilline qui en retour contrôle la dynamique d'adhésion par le biais de FAK (Zaidel-Bar et al., 2007b). Les activités de FAK et de la paxilline seraient régulées en fonction de la concentration cytosolique de leurs formes phosphorylées et plus exactement du ratio Paxilline phosphorylée/FAK (Zaidel-Bar et al., 2007b).

La surexpression de la protéine Lnk favorise la phosphorylation de la paxilline et de FAK mais entraîne également, en parallèle, une augmentation de l'expression de FAK. Ces modifications altèrent les concentrations mais aussi les ratios entre formes phosphorylées et non. De ce fait, Lnk pourrait être responsable d'une dérégulation de la dynamique des AF et d'une inhibition du turnover des points d'adhésion formés dans les CE.

Les protéines kinases p42-44 MAPK sont des substrats de la voie FAK-Src et peuvent être localisées au niveau des sites d'adhésion (Fincham et al., 2000). L'inhibition chimique de la phosphorylation de p42-44 MAPK inhibe le turnover des AF qui deviennent plus larges et se répartissent sur l'ensemble de la cellule. L'augmentation de la stabilité des AF réduit ainsi la migration cellulaire. Plusieurs études ont montré que Lnk inhibe la phosphorylation de p42-44 MAPK (Takaki et al., 2002) (Tong et al., 2005) (Takizawa et al., 2008) (Fitau et al., 2006) et nous avons établi que Lnk augmente le nombre d'AF tout en diminuant la migration. Afin de poursuivre la caractérisation des fonctions de Lnk dans la voie des intégrines et des AF, il serait important d'analyser le rôle joué par l'inhibition de la voie des MAPK dans le phénotype des CE surexprimant Lnk.

Nous avons également constaté une augmentation du nombre de fibres de stress induite par Lnk. Celle-ci est à l'origine d'une forte tension cellulaire qui empêcherait d'autant plus la dissociation des AF.

Afin de comprendre le processus par lequel Lnk régule le nombre d'adhésions focales, il apparaît important de considérer l'aspect dynamique de la formation et du turnover des structures adhésives. L'observation de cellules vivantes exprimant Lnk ainsi que des protéines de fusion fluorescentes des AF, permettrait de suivre en direct l'association et la dissociation des complexes protéiques. Il serait alors possible de déterminer si Lnk favorise la formation des AF et/ou inhibe leur désassemblage. La visualisation de la protéine Lnk fusionnée à un fluorochrome par vidéomicroscopie, apporterait également des éléments de réponse quant aux mécanismes d'action de cette protéine adaptatrice.

Les GTPases de la famille Rho : des régulateurs majeurs du cytosquelette d'actine

La famille des Rho GTPases est une classe de protéines essentielle à la régulation du cytosquelette d'actine et à la dynamique des points d'adhésion. Ces monomères de 20 à 30

kDa font partie de la superfamille de Ras. Chez les mammifères, 22 gènes codants pour des GTPases Rho ont été recensés (Jaffe et Hall, 2005). Les GTPases les plus caractérisées, notamment pour leur implication dans la régulation du cytosquelette d'actine, sont RhoA couramment appelée Rho, Rac1 et Cdc42 (Etienne-Manneville et Hall, 2002). Comme leur nom l'indique, les GTPases fixent le GTP et l'hydrolysent en GDP. Elles oscillent ainsi entre un état actif lié au GTP, capable d'interagir avec des effecteurs situés en aval, et un état inactif lié au GDP (Wennerberg et al., 2005). Les protéines Rho ont des activités intrinsèques de chargement et d'hydrolyse du GTP relativement faibles. C'est pourquoi la transition entre l'état inactif et l'état actif est régulée par trois types de protéines. Les facteurs d'échange de nucléotide guanylique GEFs (*guanine nucleotide exchange factor*) activent les GTPases en favorisant l'échange du GDP par le GTP, alors que les facteurs GAPs (*GTPase activating protein*) inactivent les GTPases en stimulant l'activité intrinsèque d'hydrolyse du GTP. La famille de facteurs inhibiteurs GDIs (*guanine nucleotide dissociation inhibitor*) lie les GTPases et les séquestre dans le cytosol dans une conformation inactive (Figure 29) (Rossman et al., 2005).

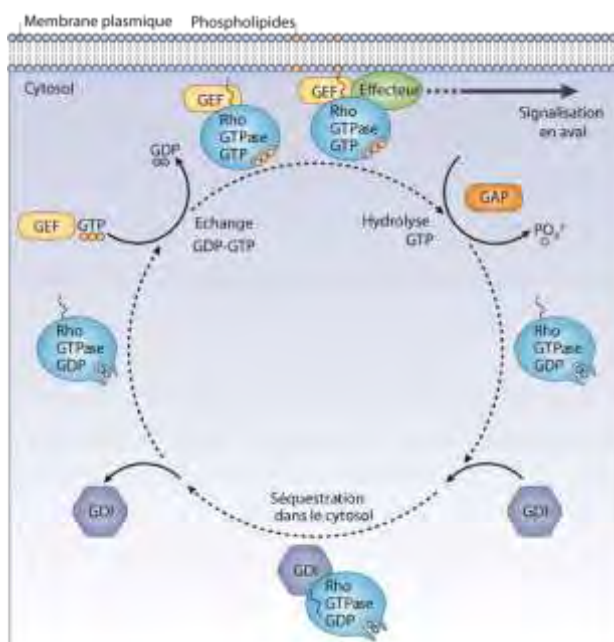


Figure 29. Le cycle des RhoGTPases. Les Rho GTPases sont inactives lorsqu'elles sont liées au GDP et actives lorsqu'elles sont liées au GTP. Ce cycle est régulé par les facteurs GAP, GEF et GDI. D'après (Iden et Collard, 2008)

La régulation de la dynamique du cytosquelette d'actine et des AF confère aux protéines Rho la capacité de contrôler la forme, la polarité, l'attachement, l'étalement et la migration des cellules.

L'activité de Rho est associée à l'assemblage des AF, à la contraction et la rétraction cellulaire. Un effecteur important de Rho est la famille des Rho kinases ROCK qui induit la

formation des fibres de stress d'actine et leur contraction. ROCK phosphoryle la kinase LIM (LIMK) ce qui participe à la réorganisation de l'actine en stabilisant les filaments d'actine par l'inhibition de la cofiline (Maekawa et al., 1999). De plus, ROCK régule l'activité de la myosine en agissant sur l'état de phosphorylation des MLC par l'inhibition de leur phosphatase (Kawano et al., 1999). La phosphorylation des MLC induit l'augmentation de l'activité ATPasique de la myosine-II responsable de la contractilité du cytosquelette d'actine. La liaison de Rho à l'effecteur mDia participe également à la polymérisation de l'actine et la formation des fibres de stress (Figure 30).

Contrairement à Rho, la présence de Rac et Cdc42 est indispensable à la formation des adhésions précoces et des complexes focaux au front de migration des cellules. Le principal rôle de Rac est de générer une force protrusive par la polymérisation locale de l'actine formant le lamellipode. La protéine Cdc42 induit également l'élongation de l'actine mais est à l'origine de la formation des filopodes (Nobes et Hall, 1995). Les principaux effecteurs cellulaires de Rac et Cdc42 sont la sérine/thréonine kinase PAK et les membres des familles WASP et WAVE. La fixation de Rac ou de Cdc42 entraîne l'activation de la kinase PAK qui phosphoryle LIMK. L'activation de LIMK permet la phosphorylation de la cofiline et la stabilisation des filaments d'actine (Arber et al., 1998). PAK régule également le turnover des AF par le biais du facteur d'échange PIX (PAK-interacting exchange factor) (Obermeier et al., 1998). Les protéines WAVE et WASP activées respectivement par Rac et Cdc42, stimulent le complexe Arp2/3 capable d'initier la nucléation de l'actine *de novo* ou à partir d'un filament préexistant (Takenawa et Miki, 2001) (Figure 30).

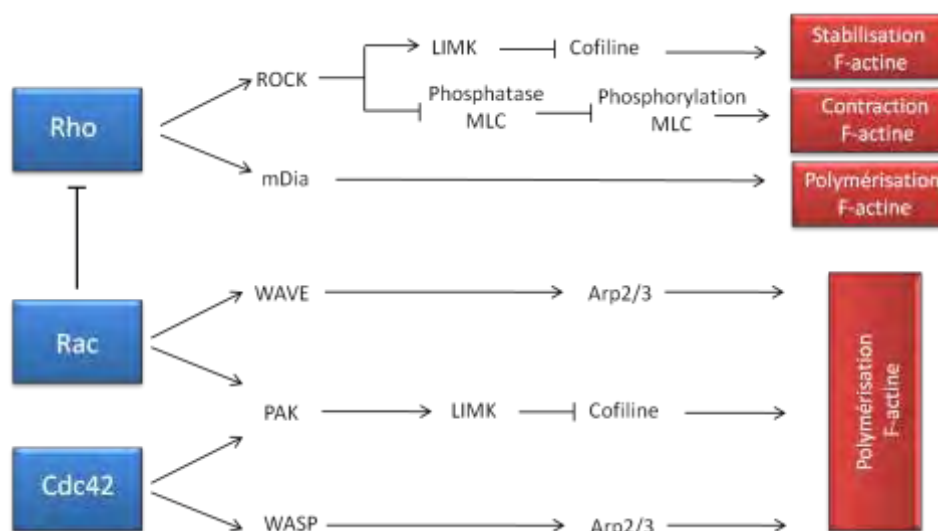


Figure 30. Signalisation des Rho GTPases régulant l'organisation des filaments d'actine
D'après (Raftopoulou et Hall, 2004)

Les membres de la famille SH2B ont montré des liens directs avec les Rho GTPases.

Ainsi, SH2B1 β co-immunoprécipite avec Rac1 dans les fibroblastes (Diakonova et al., 2002). L'inhibition de cette interaction, par l'expression d'un mutant de SH2B1 β , inhibe la motilité des fibroblastes ainsi que la formation des renflements membranaires induite par l'hormone de croissance (Diakonova et al., 2002) (O'Brien et al., 2003). Ces résultats suggèrent que SH2B1 β facilite le réarrangement de l'actine et la migration cellulaire en recrutant Rac.

La protéine APS, quant à elle, se lie à Vav3, un facteur GEF de RhoA, RhoG et Rac1, et augmente son activité (Yabana et Shibuya, 2002). APS et vav3 semblent coopérer dans l'induction de la réorganisation du cytosquelette d'actine des fibroblastes. De plus l'activation de vav3 par APS pourrait participer à la signalisation du récepteur des LB, les deux protéines étant phosphorylées par la stimulation du BCR (Zeng et al., 2000) (Yokouchi et al., 1997).

Ces différentes études laissent présumer d'un possible rôle pour Lnk dans la régulation de l'activité des Rho GTPases. Nos différents résultats impliquant Lnk dans la migration, l'adhésion et l'augmentation des fibres de stress, sont en accord avec cette hypothèse. Il serait donc pertinent de quantifier l'activité des Rho GTPases, par exemple par des expériences de *Pull down*, dans des CE surexprimant ou au contraire déficientes en Lnk.

L' α -parvine : une cible moléculaire pour Lnk

L'expression soutenue de Lnk favorise l'adhésion et l'étalement des CE. La modification de ces processus cellulaires pourrait être provoquée par la diminution du taux de l' α -parvine induite par Lnk. Cette hypothèse est conforme aux observations de Lalonde *et al.* dont les travaux ont démontré que l'extinction de l' α -parvine augmente l'adhésion des fibroblastes par le biais de l'inactivation de l'activité de la cofiline (LaLonde et al., 2005). Dans le but de tester cette hypothèse, nous examinerons prochainement la phosphorylation de la cofiline dans notre modèle d'induction de Lnk. Les sites d'adhésion plus nombreux et répartis sur l'ensemble de la cellule, peuvent également expliquer la plus forte adhérence des CE à la matrice de collagène.

Nous avons montré que la surexpression de Lnk inhibe la migration cellulaire dans un test de recouvrement. Les cellules infectées par l'adénovirus Lnk présentent une modification de leur morphologie, avec un allongement du corps cellulaire et une augmentation des fibres de stress. Elles présentent une motilité réduite et semblent émettre plus difficilement les lamellipodes indispensables à leur déplacement orienté.

L'emploi de siRNA dirigés contre l' α -parvine a confirmé le rôle majeur de cette protéine dans le processus de migration cellulaire (Clarke et al., 2004) (Fukuda et al., 2003). Nous avons observé que l'inhibition de l' α -parvine réduit de façon significative la migration des CE. Afin d'analyser l'impact de la baisse du taux de l' α -parvine sur la migration des CE surexprimant Lnk, nous avons réalisé des transfections de plasmides codant pour la protéine α -parvine fonctionnelle ou mutée. Nos résultats révèlent que la réduction de la migration induite par Lnk, est en partie médiée par la diminution de l'expression de l' α -parvine. Cependant, le mécanisme par lequel l'inhibition de l' α -parvine affecte la migration cellulaire reste à définir.

Lnk : mode d'action dans la signalisation des intégrines

Nous avons démontré que Lnk co-immunoprécipite avec ILK dans les CE. Nous ne pouvons cependant pas conclure quant à l'interaction directe ou non des deux protéines, c'est pourquoi nous évoquons la formation d'un complexe ILK-Lnk. Seules des expérimentations complémentaires utilisant la technique de double hybride ou des protéines purifiées permettraient de répondre à cette question. De plus, si ces méthodes prouvaient une liaison directe entre Lnk et ILK, l'identification des domaines mis en jeu dans l'interaction des deux protéines serait une étape importante de leur caractérisation.

Nous avons observé que la surexpression de Lnk entraîne une diminution de l'expression de l' α -parvine qui est dose dépendante. En parallèle, les taux d'expression des protéines ILK et PINCH-1 ont été contrôlés et n'ont révélé aucune différence significative entre des cellules surexprimant ou non Lnk.

Contrairement à nos résultats, l'étude de Fukuda *et al.* a montré une interdépendance des composants du complexe IPP (Fukuda et al., 2003). Ainsi, la délétion d'ILK par siRNA entraîne une baisse importante de l'expression de PINCH-1 et une diminution plus modérée de celle de l' α -parvine. De même, l'inhibition de PINCH-1 engendre une forte baisse du taux d'ILK mais affecte peu l'expression de l' α -parvine. Quant aux siRNA α -parvine, ils provoquent

une légère diminution d'ILK et de PINCH-1. La « disparition » des protéines est le résultat de l'activité du protéasome, dont l'inhibition prévient la dégradation des trois protéines ILK, PINCH-1 et α -parvine. Ces travaux démontrent que la formation du complexe IPP augmente la stabilité de ses composants en les protégeant de la protéolyse (Fukuda et al., 2003).

Les différences entre nos travaux et ceux de Fukuda peuvent être expliquées par un rôle mineur de l' α -parvine dans le maintien des autres composants du complexe. En effet, les expériences de RNAi montrent un impact moindre de l'extinction de l' α -parvine sur la stabilité d'ILK et de PINCH-1. Il est donc possible que la diminution de l'expression de l' α -parvine, médiée par Lnk, provoque une baisse des taux d'ILK et de PINCH-1 trop faible pour être détectée par Western Blot. Une autre possibilité est que la formation du complexe ILK-Lnk participe à l'équilibre d'ILK et de PINCH-1 et contrebalance la dégradation de l' α -parvine. Enfin, il a été démontré que la surexpression de PINCH-2 prévient la protéolyse d'ILK et de l' α -parvine entraînée par la perte de l'expression de PINCH-1 (Fukuda et al., 2003). Il est donc envisageable que l'absence de l' α -parvine soit compensée par une forte expression de la β -parvine dans les CE. Dans nos prochaines expérimentations, nous testerons le niveau d'expression de la β -parvine. De plus, l'utilisation d'un inhibiteur du protéasome nous permettra de mieux comprendre le mécanisme par lequel Lnk diminue le taux d'expression de l' α -parvine.

Les expériences de co-immunoprécipitation ont révélé que la formation du complexe ILK-Lnk est favorisée par la surexpression de Lnk, qui serait le facteur limitant de cette liaison. Ainsi, plus la protéine Lnk est exprimée et plus elle s'associe à ILK. De plus, nous avons observé qu'une faible surexpression de Lnk inhibe l'association entre ILK et l' α -parvine, sans altérer l'expression de l' α -parvine. Ces résultats suggèrent que l'expression accentuée de Lnk stimule l'assemblage du complexe ILK-Lnk au dépens de l'association ILK- α -parvine.

Nous proposons un modèle dans lequel l'action de Lnk s'effectue en deux temps et est dépendante de son taux d'expression cytoplasmique et de sa phosphorylation. L'engagement des intégrines conduit tout d'abord à l'activation et la phosphorylation de Lnk qui participe à la transduction des signaux, notamment par sa liaison avec ILK. Puis dans un deuxième temps, l'expression plus soutenue de Lnk contribue à un rétrocontrôle et une régulation négative de la voie des intégrines qui conduit à la réduction de la migration par l'inhibition de l' α -parvine. Ce modèle reste cependant hypothétique et doit être confirmé,

par exemple, par l'analyse des CE de souris $Lnk^{-/-}$ ou par l'utilisation de siRNA Lnk . La mise en place d'un modèle plus physiologique de l'induction de l'expression de Lnk et de l'activation des intégrines serait également un atout dans la poursuite de cette étude.

Protection contre l'apoptose par anoïkis des CE humaines et porcines par Lnk

Les cellules qui perdent le contact avec la matrice extracellulaire meurent rapidement. Ce phénomène appelé anoïkis protège à la fois de la prolifération ectopique des cellules et de leur migration. La mort cellulaire par anoïkis est donc un processus physiologique qui évite l'altération de l'architecture tissulaire et les événements initiateurs de l'invasion et du développement métastatique. Le programme de mort cellulaire est le résultat de l'activation de deux voies principales : la première dite extrinsèque met en jeu la famille des récepteurs de mort, et la deuxième appelée intrinsèque fait intervenir les molécules de la famille de Bcl-2. L'anoïkis qui concourt à la mort cellulaire est due à l'association de ces deux voies qui sont initiées par les intégrines (Frisch et Ruoslahti, 1997).

L'implication de Lnk dans la voie des intégrines, ajoutée à son rôle d'activateur de la voie de survie PI3K (Fitau et al., 2006) (Wan et al., 2007), nous ont incités à étudier l'effet de la surexpression de Lnk sur l'apoptose par anoïkis. Ainsi, nous avons observé que Lnk protège les CE de l'anoïkis *via* la phosphorylation d'Akt et de GSK3 β . Il a été montré par ailleurs que la surexpression d'ILK confère aux cellules épithéliales maintenues en suspension une résistance à l'apoptose (Attwell et al., 2000). De plus, l'anoïkis et l'activation de la caspase 3 peuvent être stimulées par l'inhibition d'ILK ou par l'expression d'un dominant négatif d'Akt. Ces résultats suggèrent l'implication de la kinase Akt dans la protection contre l'apoptose induite par ILK. Il a également été rapporté que l'expression et l'activation de la protéine ILK augmentent la phosphorylation de la sérine 473 d'Akt et inhibent la kinase GSK3 β (Lynch et al., 1999) (Persad et al., 2001). Ces données laissent penser que Lnk pourrait conduire à la phosphorylation d'Akt et de GSK3 β , et donc à la transmission d'un signal de survie, en favorisant l'activité d'ILK. Il est possible que la protéine adaptatrice Lnk , par son interaction avec ILK, aide à la formation d'un complexe multiprotéique rapprochant physiquement ILK et les kinases Akt et GSK3 β .

De plus, on ne peut exclure la possibilité que Lnk agisse directement sur la cascade des caspases. Ces protéases sont présentes dans les cellules au repos sous forme inactive appelée pro-caspase. Un clivage protéolytique induit leur activation et pour certaines le

regroupement de leurs sous-unités catalytiques p20 et p10. Il existe deux types de caspases : les initiatrices (caspases 1, 2, 4, 8, 9 et 10) qui régulent l'activation des autres caspases dites effectrices (caspases 3, 6 et 7). Ces dernières clivent de nombreuses molécules responsables de la mise en place de l'apoptose. Parmi les cibles des caspases effectrices, on peut citer ICAD (*inhibitor of caspase-activated Dnase*), un inhibiteur spécifique des CAD (*caspase-activated Dnase*), capable de fragmenter l'ADN. L'étude du processus d'anoïkis a montré que les intégrines non liées peuvent recruter directement la caspase 8 à la membrane et l'activer (Stupack et al., 2001). Celle-ci provoque alors la dimérisation des caspases effectrices 7 et 3 conduisant à l'initiation de l'apoptose. Cette cascade d'activation des caspases peut être bloquée au niveau de l'activation de la caspase 8 par l'inhibiteur FLIP. Nous testerons prochainement l'impact de l'expression de Lnk sur l'activation de la caspase 8 et l'expression de FLIP.

Rôle cytoprotecteur de Lnk en xénotransplantation

Au-delà de la protection de l'anoïkis, nous avons rapporté que la protéine Lnk possède des propriétés anti-apoptotiques plus globales. Dans notre étude du transfert du gène Lnk humain à des PAEC, nous avons choisi d'induire l'apoptose des CE porcines en les activant par du TNF α en présence d'un inhibiteur de la synthèse des ARN, l'actinomycine D. L'activation de la voie apoptotique du TNF α nécessite l'inhibition de la synthèse des protéines de survie, activée par le facteur de transcription NF κ B. La suppression de l'expression des protéines telles que A1, A20, Bcl2 ou HO-1 induit l'apoptose des CE (Pohlman et Harlan, 1989). Ce modèle bien caractérisé a été utilisé dans de nombreuses études pour l'identification de molécules anti-apoptotiques (Karsan et al., 1996) (Ferran et al., 1998) (Brouard et al., 2000). Son utilisation nous a permis de montrer que l'expression soutenue de Lnk protège les cellules de la mort cellulaire programmée, phénomène attesté par la diminution de l'activité des caspases 3/7.

Le facteur de transcription NF κ B activé par le TNF α , est responsable de l'expression et de la régulation d'un panel de gènes protecteurs. Nous n'avons pas pu démontrer de modification par Lnk de l'activation ou de la dégradation de l'inhibiteur spécifique de NF κ B, I κ B α (Fitau et al., 2006). De même, Lnk n'a pas d'effet sur la translocation de la sous-unité p65 de NF κ B du cytoplasme vers le noyau dans les CE traitées par du TNF α (Fitau et al.,

2006). Cependant, ces résultats ne sont pas suffisants pour écarter la possibilité que Lnk intervienne dans la régulation de NF κ B, soit par le contrôle de la phosphorylation de sites importants pour son activité, soit par la régulation nucléaire de ce facteur de transcription. Par ailleurs, nous avons montré que Lnk est une molécule inductible par le TNF α , il serait intéressant de définir si cette régulation rapide et transitoire est sous le contrôle de NF κ B.

Nos précédents travaux ont montré que l'activation de la PI3K induite par Lnk conduit à la surexpression de l'enzyme NOS3 et de la molécule HO-1 dans les CE humaines (Fitau et al., 2006). Ces résultats restent à confirmer dans les CE porcines mais se heurtent au manque de réactif adapté pour le porc. Cependant, les résultats chez l'homme et le porc étant comparables, nous supposons que les mécanismes mis en jeu sont similaires. Ainsi, les propriétés anti-apoptotiques et anti-inflammatoires de Lnk pourraient résulter de l'augmentation de HO-1. En effet, les fonctions anti-inflammatoires de HO-1 dans les CE, sont corrélées à une diminution de l'expression de VCAM-1 (Soares et al., 2004). De même, HO-1 protège les CE de l'apoptose par la production de monoxyde de carbone (Brouard et al., 2000). Les conséquences fonctionnelles de l'activation de la PI3K, de l'expression de HO-1 et de l'activation de NOS3 par Lnk, restent à caractériser dans les CE porcines.

Enfin, nous avons réalisé des réactions de PCR quantitative sur carte microfluidique (TLDA, Applied Biosystems) permettant de quantifier l'expression de 88 gènes en parallèle. Nous avons ainsi comparé l'expression d'un panel de gènes pro- ou anti-apoptotiques dans des cellules transduites par l'adénovirus codant pour Lnk et des cellules contrôles transduites par l'adénovirus codant pour la GFP. Seuls les transcrits montrant une régulation supérieure à 5 fois le taux contrôle ont été retenus comme gènes candidats. Cette technique a mis en évidence un profil général anti-apoptotique des cellules surexprimant Lnk avec notamment une induction des transcrits de Bcl2, Bcl-xL et CARD9 (5,1 ; 13,3 ; 17,7 fois le contrôle, respectivement). Ces résultats doivent cependant être confirmés par PCR quantitative classique, puis par Western Blot afin de s'assurer de la corrélation des taux protéiques. Ces données, si elles étaient confirmées, démontreraient le rôle protecteur de Lnk par l'inhibition de la voie intrinsèque de l'apoptose mitochondriale. Ce mécanisme se traduit par la perte du potentiel transmembranaire mitochondrial, due à l'augmentation de la perméabilité du pore PT (*permeability transition*). Ce phénomène résulte de la translocation des molécules pro-apoptotiques de la famille de Bcl-2, qui s'associent à des protéines « canaux » constituant le pore PT au sein de la membrane mitochondriale et

permettent ainsi le relargage de nombreuses molécules, dont le cytochrome c, Apaf-1 et la pro-caspase 9 (Luo et al., 1998). L'association de ces trois protéines mène à l'activation de la caspase 3 (Hu et al., 1999). La voie mitochondriale est régulée par Bcl2, Bcl-xL qui inhibent le relargage du cytochrome c en interférant avec les molécules pro-apoptotiques de cette même famille Bcl2. La protéine CARD9, quant à elle, se lie à Bcl10 et active le facteur de transcription NF κ B (Bertin et al., 2000).

Modulation de l'expression de Lnk dans l'endothélium du greffon : applications en xénotransplantation

La principale barrière à l'application de la xénotransplantation chez l'homme est actuellement d'ordre immunologique. La modification de l'immunogénicité des tissus porcins par génie génétique est une voie encourageante qui permettrait le remplacement d'un organe humain déficient par une greffe d'origine animale.

Le contrôle de l'inflammation et celui des dysfonctions endothéliales sont des étapes essentielles à l'amélioration de la survie du greffon en allo et xénotransplantation. L'activation endothéliale augmente la perméabilité vasculaire et le recrutement des cellules immunes. L'expression des molécules d'adhésion par les CE, provoquée notamment par les lésions de l'endothélium, favorise l'infiltration des leucocytes dans le greffon.

Nos résultats montrent que l'expression soutenue de Lnk dans les CE porcines diminuent l'expression de VCAM-1 induite par le TNF α . De plus, Lnk prévient l'apoptose des PAEC soumises à l'anoïkis ou à la stimulation par du TNF α en présence d'actinomycine D. Ainsi, cette protéine adaptatrice, par ses propriétés anti-inflammatoires et anti-apoptotiques, répond à la définition d'un gène cytoprotecteur (Bach et al., 1997a). Il est toutefois à noter que les effets protecteurs induits par la surexpression de la protéine Lnk humaine sont plus modérés chez le porc que chez l'homme. Par exemple, l'expression de VCAM-1 médiée par le TNF α est moins atténuée par Lnk dans les CE porcines, de même les cellules de porc sont plus sensibles à l'apoptose que des cellules humaines surexprimant le transgène. La comparaison des séquences protéiques humaine et porcine de Lnk montre une homologie de 87%. Si cette protéine est relativement bien conservée entre les deux espèces, certaines différences entre les séquences sont retrouvées au niveau des domaines PH et

SH2. De par ces changements, il est possible que la protéine Lnk humaine soit moins active dans les cellules de porc.

Dans de futurs travaux, Lnk pourrait être surexprimée chez des porcs transgéniques utilisés comme receveur dans un modèle de xéno greffe porc/primate. Au vu de nos résultats, il serait important de cloner le gène porcin pour éviter les incompatibilités entre espèces. Ces travaux permettraient de tester *in vivo* l'efficacité des fonctions régulatrices de Lnk. L'expression de Lnk de porc, ajoutée à d'autres transgènes régulant le complément humain et prévenant la coagulation, pourrait apporter une prolongation substantielle de la survie des greffons. Nous souhaitons également produire au laboratoire des rats transgéniques surexprimant Lnk qui seraient utilisés dans des modèles d'allotransplantation. Les séquences entre l'homme et le rat sont encore plus dissemblables (58% d'homologie), nous obligeant au préalable à cloner l'ADNc de Lnk du rat.

De même, Lnk est impliquée dans un grand nombre de mécanismes et de types cellulaires. Sa surexpression non contrôlée pourrait s'avérer délétère comme par exemple dans les plaquettes où elle risquerait de favoriser la coagulation (Takizawa et al., 2010). Il semble donc nécessaire de restreindre l'expression de la protéine Lnk à l'endothélium par l'utilisation d'un promoteur spécifique des CE tel que celui d'ICAM-2, de PECAM-1 ou de l'endogline (Cowan et al., 2003) (Godwin et al., 2006).

Le rejet chronique d'un organe est un phénomène multifactoriel qui n'est par conséquent pas le résultat unique de l'activation du système immunitaire. Il apparaît donc important d'étudier le rejet d'organe en considérant l'ensemble de ses mécanismes et ses effecteurs. Parmi ceux-ci, l'ischémie-reperfusion subie par le greffon est un processus non immunologique qui participe activement à la reprise retardée de la fonction de l'organe greffé et sa lente détérioration (Hauet et al., 2001). Les lésions de l'ischémie-reperfusion résultent d'une succession d'évènements qui implique la diminution de la production d'ATP intracellulaire, l'entrée de calcium, de sodium et d'eau dans les cellules, l'activation des CE conduisant à l'infiltration de neutrophiles dans les tissus ischémiés (Massberg et Messmer, 1998) (Turer et Hill, 2010). L'apoptose des cellules concourt également à ce phénomène (Yaoita et al., 1998). Dans l'optique de définir l'importance de Lnk en transplantation, il serait pertinent d'étudier le rôle possible de Lnk dans le mécanisme d'ischémie-reperfusion.

Le risque sanitaire et les considérations éthiques liés à la xéno transplantation

La xéno greffe permettrait de pallier la pénurie d'organes, à condition de s'assurer qu'elle est sans risque pour le patient et la société. Une inquiétude au regard du risque sanitaire en xénotransplantation, est la possibilité de transmission de pathogènes porcins au receveur humain et de façon plus large à la communauté. À la différence de l'allotransplantation, et à condition de maintenir les animaux dans des conditions exemptes d'organismes pathogènes spécifiques, il est possible d'éviter la transmission de la plupart des agents infectieux, en particulier le cytomégalovirus (Gollackner et al., 2003). Cependant, un risque important concerne les virus endogènes intégrés dans le génome porcin : les PERV (*porcin endogenous retrovirus*) A, B et C. *In vitro*, les PERV peuvent infecter de façon productive des cellules humaines (Martin et al., 2000). Cependant, plusieurs études menées chez des patients ayant brièvement été en contact avec des tissus porcins n'ont pas montré de signes d'infection (Levy et al., 2000) (Elliott et al., 2000), ce qui suggère que cette transmission ne se produit pas *in vivo*. De plus, une race miniature de porcs générée par génie génétique, présente la particularité d'être incapable de transmettre les virus PERV à des cellules humaines *in vitro* (Oldmixon et al., 2002). Une sélection de l'espèce porcine pourrait ainsi limiter les risques de transmission virale. Enfin, une étude récente a décrit la génération de porcs exprimant des siRNA qui suppriment l'expression des ARN des PERV. Cette approche offrirait l'avantage de cibler les PERV avant toute recombinaison avec un virus humain pathogène (Ramsoondar et al., 2009).

L'Association Internationale de la Xénotransplantation a publié un ensemble de principes dans le but de prévenir ces risques infectieux (Sykes et al., 2003). Elle recommande qu'un essai clinique en xénotransplantation ne soit envisagé que si les résultats précliniques indiquent une forte probabilité de réussite et de bénéfices pour le receveur. L'exigence sécuritaire est également une condition à la réalisation de xéno greffes. Ainsi, l'absence de pouvoir infectieux des tissus porcins doit être démontrée avant toute greffe chez l'homme. Enfin, les auteurs souhaitent que dans un futur proche, la xénotransplantation clinique soit encadrée par les autorités nationales de la santé et encouragent à une harmonisation internationale des cadres légaux liés à cette pratique.

Importance de la voie Notch dans la dysfonction endothéliale

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 reste à élucider. A ce jour, plusieurs études ont montré que les récepteurs Notch sont impliqués dans la différenciation, la prolifération et l'apoptose des CE (MacKenzie et al., 2004) (Nosedá et al., 2004a) (Nosedá et al., 2004b). De plus, de précédents travaux ont rapporté 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 et al., 2003) (Hiratochi et al., 2007).

Nous avons étudié quels 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 Notch1, 2, 3, 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 et al., 2000), nous avons détecté la présence de ce récepteur dans les CE au repos (résultat non montré). Comme décrit précédemment, les CE quiescentes expriment *in vivo* et *in vitro* toutes les molécules de cette voie (Iso et al., 2003a).

Dans une première étude, nous avons montré que le TNF α et l'IL1 β entraînent une régulation spécifique de la voie Notch. En effet, dans les CE vasculaires, ces cytokines induisent une forte modulation du profil d'expression en diminuant l'expression transcriptionnelle et protéique de Notch4 tout en induisant celle de Notch2. De plus, nous avons montré que ces régulations dépendent de voies de signalisation distinctes, soit de l'activation de NF κ B pour Notch4 et de la PI3K pour Notch2. De même, la transcription des gènes effecteurs *hes1* et *hey2* est diminuée alors que celle de *hey1* est augmentée dans les CE activées. Ces résultats montrent que ces gènes sont sous le contrôle de récepteurs Notch distincts. Ainsi *hes1* et *hey2* seraient des gènes cibles de Notch4, et *hey1* serait sélectivement induit par Notch2. Cependant, l'activité globale de la voie, attestée par un système rapporteur dépendant de CBF1, est fortement inhibée dans les CE traitées par les cytokines inflammatoires. Il apparaît donc probable que la baisse d'activité de la voie Notch dans les CE activées soit le résultat de la baisse d'expression de Notch4.

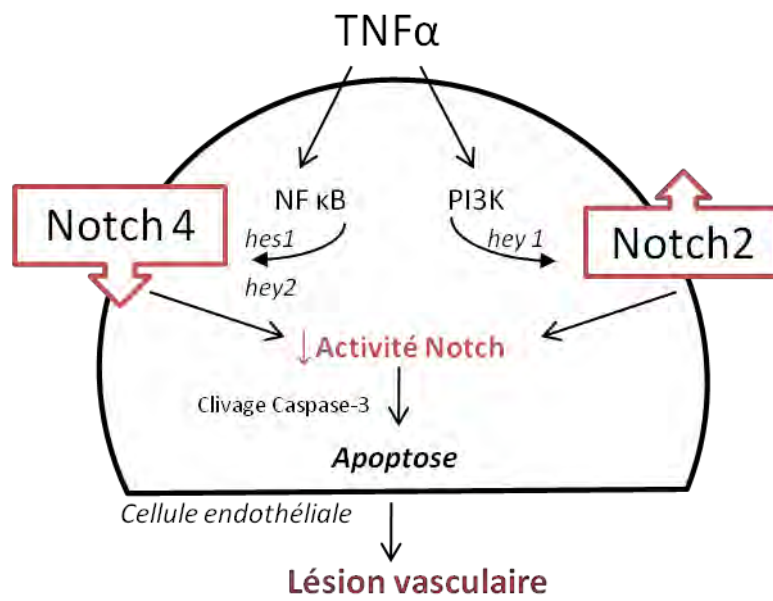


Figure 31. Régulation et fonction de la voie Notch par le TNF α dans les CE

La conséquence fonctionnelle de ces régulations, médiées par le TNF α , est une diminution de la viabilité cellulaire par l'induction d'une forte apoptose. La modification de l'expression de Notch4 ou Notch2 favorise la mort cellulaire. De plus, cet effet pro-apoptotique est amplifié par les changements concomitants de l'expression de ces deux récepteurs Notch. Ces résultats montrent qu'une altération du profil d'expression des récepteurs Notch par les cytokines pro-inflammatoires conduit à une dysfonction vasculaire caractérisée par l'apoptose des CE.

Dans un deuxième temps, nous avons défini plus précisément le rôle du récepteur Notch2 qui reste peu étudié. A l'aide d'un adénovirus codant pour le domaine intracellulaire actif de Notch2 (N2ICD), nous avons testé la relevance fonctionnelle de la surexpression de Notch2 dans la dysfonction endothéliale. Nos résultats montrent que l'activité de Notch2 favorise l'apoptose des CE en réprimant la survivine. La survivine est une protéine inhibitrice de l'apoptose (*inhibitor of apoptosis protein*, IAP) qui est surexprimée dans de nombreux cancers et a été décrite dans les lésions vasculaires (Blanc-Brude et al., 2002). Nous avons montré que l'expression ectopique de la survivine suffit à prévenir l'apoptose induite par N2ICD. 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.

Lnk et Notch semblent réguler des fonctions cellulaires communes telles que l'apoptose, la prolifération ou la différenciation cellulaires. De plus, la voie Notch est impliquée dans le processus d'angiogenèse et l'association Notch/Dll4 contrôlerait l'émergence du bourgeonnement vasculaire et l'émission des filopodes par la CE (Suchting et al., 2007). Afin de tester l'existence d'un possible lien entre ces deux protéines, nous analyserons l'expression de Lnk lorsque la voie Notch est activée et inversement l'activation de la voie Notch lors de la régulation de l'expression de Lnk.

Conclusion

Ce travail de thèse a permis de mettre en évidence les rôles multiples de la protéine Lnk dans la signalisation des CE. La capacité à réguler un grand nombre de fonctions cellulaires repose sur la nature même de cette molécule. En tant que protéine adaptatrice, Lnk ne possède pas d'activité enzymatique mais contrôle la formation des complexes protéiques à l'origine de la transduction des signaux de la membrane jusqu'au noyau des cellules. Son expression ubiquitaire et ses différents sites d'interaction protéique lui permettent de réguler indépendamment de nombreuses voies de signalisation. Ainsi, nos travaux ont montré que Lnk module l'activation endothéliale mais aussi les processus d'adhésion et de migration des CE. Bien que différents, ces phénomènes biologiques nécessitent l'implication de voies identiques telles que la PI3K/Akt dont la spécification mais aussi l'amplification ou l'inhibition s'appuient sur des modulateurs que sont les protéines adaptatrices.

Au cours de ces trois dernières années, des travaux importants ont été publiés faisant état de la relation entre un polymorphisme de Lnk et de nombreuses pathologies immunes (diabète, maladie coéliquaue, lupus érythémateux systémique) et cardiovasculaires (Cooper et al., 2009) (Amundsen et al., 2010) (Gateva et al., 2009) (Newton-Cheh et al., 2009). Il est intéressant de noter que l'endothélium est un acteur majeur de ces pathologies. D'autre part, il a été montré que Lnk contrôle le développement des progéniteurs endothéliaux (Kwon et al., 2009). Ces données confirment le rôle essentiel de Lnk dans les processus cellulaires et proposent la régulation de Lnk comme approche thérapeutique (Kamei et al., 2010). Nos résultats corroborent ces données et montrent que Lnk est un adaptateur clé de la signalisation endothéliale. De plus, ils suggèrent qu'une modulation contrôlée dans le temps et l'espace permettrait de limiter l'activation et l'apoptose des CE. La suite de ce travail sera de valider ces hypothèses dans des modèles animaux.

Bibliographie

Bibliographie

- Abercrombie, M., Dunn, G. A., et Heath, J. P. (1977). The shape and movement of fibroblasts in culture. *Soc. Gen. Physiol. Ser* 32, 57-70.
- Abercrombie, M., Heaysman, J. E., et Pegrum, S. M. (1971). The locomotion of fibroblasts in culture. IV. Electron microscopy of the leading lamella. *Exp. Cell Res* 67, 359-367.
- Ahmed, Z., Smith, B. J., et Pillay, T. S. (2000). The APS adapter protein couples the insulin receptor to the phosphorylation of c-Cbl and facilitates ligand-stimulated ubiquitination of the insulin receptor. *FEBS Lett* 475, 31-34.
- Ahmed, Z., et Pillay, T. S. (2003). Adapter protein with a pleckstrin homology (PH) and an Src homology 2 (SH2) domain (APS) and SH2-B enhance insulin-receptor autophosphorylation, extracellular-signal-regulated kinase and phosphoinositide 3-kinase-dependent signalling. *Biochem. J* 371, 405-412.
- Ahn, M., Katsanakis, K. D., Bheda, F., et Pillay, T. S. (2004). Primary and essential role of the adaptor protein APS for recruitment of both c-Cbl and its associated protein CAP in insulin signaling. *J. Biol. Chem* 279, 21526-21532.
- Aird, W. C. (2005). Spatial and temporal dynamics of the endothelium. *J. Thromb. Haemost* 3, 1392-1406.
- Aird, W. C. (2006). Endothelium and allotransplantation. *Transplantation* 82, S6-8.
- Aird, W. C. (2007). Phenotypic heterogeneity of the endothelium: II. Representative vascular beds. *Circ. Res* 100, 174-190.
- Akamatsu, Y., Haga, M., Tyagi, S., Yamashita, K., Graça-Souza, A. V., Ollinger, R., Czismadia, E., May, G. A., Ifedigbo, E., Otterbein, L. E., et al. (2004). Heme oxygenase-1-derived carbon monoxide protects hearts from transplant associated ischemia reperfusion injury. *FASEB J* 18, 771-772.
- Albiges-Rizo, C., Destaing, O., Fourcade, B., Planus, E., et Block, M. R. (2009). Actin machinery and mechanosensitivity in invadopodia, podosomes and focal adhesions. *J. Cell. Sci* 122, 3037-3049.
- Alcina, A., Vandebroek, K., Otaegui, D., Saiz, A., Gonzalez, J. R., Fernandez, O., Cavanillas, M. L., Cénit, M. C., Arroyo, R., Alloza, I., et al. (2010). The autoimmune disease-associated KIF5A, CD226 and SH2B3 gene variants confer susceptibility for multiple sclerosis. *Genes Immun*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gate2.inist.fr/pubmed/20508602> [Accédé Juillet 1, 2010].
- Alexandre, G. P., Squifflet, J. P., De Bruyère, M., Latinne, D., Reding, R., Gianello, P., Carlier, M., et Pirson, Y. (1987). Present experiences in a series of 26 ABO-incompatible living donor renal allografts. *Transplant. Proc* 19, 4538-4542.
- Alvarez, B., Martínez-A, C., Burgering, B. M., et Carrera, A. C. (2001). Forkhead transcription factors contribute to execution of the mitotic programme in mammals. *Nature* 413, 744-747.
- Amundsen, S. S., Rundberg, J., Adamovic, S., Gudjónsdóttir, A. H., Ascher, H., Ek, J., Nilsson, S., Lie, B. A., Naluai, A. T., et Sollid, L. M. (2010). Four novel coeliac disease regions replicated in an association study of a Swedish-Norwegian family cohort. *Genes Immun* 11, 79-86.

- Annane, D., Bellissant, E., et Cavaillon, J. (2005). Septic shock. *Lancet* 365, 63-78.
- Aoudjit, F., et Vuori, K. (2001). Matrix attachment regulates Fas-induced apoptosis in endothelial cells: a role for c-flip and implications for anoikis. *J. Cell Biol* 152, 633-643.
- Applewhite, D. A., Barzik, M., Kojima, S., Svitkina, T. M., Gertler, F. B., et Borisy, G. G. (2007). Ena/VASP proteins have an anti-capping independent function in filopodia formation. *Mol. Biol. Cell* 18, 2579-2591.
- Arber, S., Barbayannis, F. A., Hanser, H., Schneider, C., Stanyon, C. A., Bernard, O., et Caroni, P. (1998). Regulation of actin dynamics through phosphorylation of cofilin by LIM-kinase. *Nature* 393, 805-809.
- Arnaut, M. A., Goodman, S. L., et Xiong, J. (2007). Structure and mechanics of integrin-based cell adhesion. *Curr. Opin. Cell Biol* 19, 495-507.
- Asahara, T., Murohara, T., Sullivan, A., Silver, M., van der Zee, R., Li, T., Witzenbichler, B., Schatteman, G., et Isner, J. M. (1997). Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 275, 964-967.
- Askari, J. A., Buckley, P. A., Mould, A. P., et Humphries, M. J. (2009). Linking integrin conformation to function. *J Cell Sci* 122, 165-170.
- Attwell, S., Roskelley, C., et Dedhar, S. (2000). The integrin-linked kinase (ILK) suppresses anoikis. *Oncogene* 19, 3811-3815.
- Auerbach, R., Alby, L., Morrissey, L. W., Tu, M., et Joseph, J. (1985). Expression of organ-specific antigens on capillary endothelial cells. *Microvasc. Res* 29, 401-411.
- Augustin, H. G., Kozian, D. H., et Johnson, R. C. (1994). Differentiation of endothelial cells: analysis of the constitutive and activated endothelial cell phenotypes. *Bioessays* 16, 901-906.
- Bach, F. H., Ferran, C., Candinas, D., Miyatake, T., Koyamada, N., Mark, W., Hechenleitner, P., et Hancock, W. W. (1997a). Accommodation of xenografts: expression of "protective genes" in endothelial and smooth muscle cells. *Transplant. Proc* 29, 56-58.
- Bach, F. H., Ferran, C., Hechenleitner, P., Mark, W., Koyamada, N., Miyatake, T., Winkler, H., Badrichani, A., Candinas, D., et Hancock, W. W. (1997b). Accommodation of vascularized xenografts: expression of "protective genes" by donor endothelial cells in a host Th2 cytokine environment. *Nat. Med* 3, 196-204.
- Bach, F. H., Ferran, C., Soares, M., Wrighton, C. J., Anrather, J., Winkler, H., Robson, S. C., et Hancock, W. W. (1997c). Modification of vascular responses in xenotransplantation: inflammation and apoptosis. *Nat. Med* 3, 944-948.
- Bach, F. H., Hancock, W. W., et Ferran, C. (1997d). Protective genes expressed in endothelial cells: a regulatory response to injury. *Immunol. Today* 18, 483-486.
- Bach, F. H., Turman, M. A., Vercellotti, G. M., Platt, J. L., et Dalmaso, A. P. (1991). Accommodation: a working paradigm for progressing toward clinical discordant xenografting. *Transplant. Proc* 23, 205-207.
- Badolato, R., et Parolini, S. (2007). Novel insights from adaptor protein 3 complex deficiency. *J. Allergy Clin. Immunol* 120, 735-741; quiz 742-743.

- Badrichani, A. Z., Stroka, D. M., Bilbao, G., Curiel, D. T., Bach, F. H., et Ferran, C. (1999). Bcl-2 and Bcl-XL serve an anti-inflammatory function in endothelial cells through inhibition of NF-kappaB. *J. Clin. Invest* 103, 543-553.
- Barrès, R., Gonzalez, T., Le Marchand-Brustel, Y., et Tanti, J. (2005). The interaction between the adaptor protein APS and Enigma is involved in actin organisation. *Exp. Cell Res* 308, 334-344.
- Barrès, R., Grémeaux, T., Gual, P., Gonzalez, T., Gugenheim, J., Tran, A., Le Marchand-Brustel, Y., et Tanti, J. (2006). Enigma interacts with adaptor protein with PH and SH2 domains to control insulin-induced actin cytoskeleton remodeling and glucose transporter 4 translocation. *Mol. Endocrinol* 20, 2864-2875.
- Bear, J. E., Svitkina, T. M., Krause, M., Schafer, D. A., Loureiro, J. J., Strasser, G. A., Maly, I. V., Chaga, O. Y., Cooper, J. A., Borisy, G. G., et al. (2002). Antagonism between Ena/VASP proteins and actin filament capping regulates fibroblast motility. *Cell* 109, 509-521.
- Bendig, G., Grimmmler, M., Huttner, I. G., Wessels, G., Dahme, T., Just, S., Trano, N., Katus, H. A., Fishman, M. C., et Rottbauer, W. (2006). Integrin-linked kinase, a novel component of the cardiac mechanical stretch sensor, controls contractility in the zebrafish heart. *Genes Dev* 20, 2361-2372.
- Bersenev, A., Wu, C., Balcerek, J., Jing, J., Kundu, M., Blobel, G. A., Chikwava, K. R., et Tong, W. (2010). Lnk constrains myeloproliferative diseases in mice. *J. Clin. Invest* 120, 2058-2069.
- Bersenev, A., Wu, C., Balcerek, J., et Tong, W. (2008). Lnk controls mouse hematopoietic stem cell self-renewal and quiescence through direct interactions with JAK2. *J. Clin. Invest* 118, 2832-2844.
- Bertin, J., Guo, Y., Wang, L., Srinivasula, S. M., Jacobson, M. D., Poyet, J. L., Merriam, S., Du, M. Q., Dyer, M. J., Robison, K. E., et al. (2000). CARD9 is a novel caspase recruitment domain-containing protein that interacts with BCL10/CLAP and activates NF-kappa B. *J. Biol. Chem* 275, 41082-41086.
- Bjerknes, M., Cheng, H., et Ottaway, C. A. (1986). Dynamics of lymphocyte-endothelial interactions in vivo. *Science* 231, 402-405.
- Blanc-Brude, O. P., Yu, J., Simosa, H., Conte, M. S., Sessa, W. C., et Altieri, D. C. (2002). Inhibitor of apoptosis protein survivin regulates vascular injury. *Nat. Med* 8, 987-994.
- Bombeli, T., Mueller, M., et Haerberli, A. (1997). Anticoagulant properties of the vascular endothelium. *Thromb. Haemost* 77, 408-423.
- Borel, J. F., Feurer, C., Gubler, H. U., et Stähelin, H. (1976). Biological effects of cyclosporin A: a new antilymphocytic agent. *Agents Actions* 6, 468-475.
- Bouhours, D., Pourcel, C., et Bouhours, J. E. (1996). Simultaneous expression by porcine aorta endothelial cells of glycosphingolipids bearing the major epitope for human xenoreactive antibodies (Gal alpha 1-3Gal), blood group H determinant and N-glycolylneuraminic acid. *Glycoconj. J* 13, 947-953.
- Boulday, G., Coulon, F., Fraser, C. C., Soulillou, J., et Charreau, B. (2002). Transcriptional up-regulation of the signaling regulatory protein LNK in activated endothelial cells. *Transplantation* 74, 1352-1354.

- Bouvard, D., Brakebusch, C., Gustafsson, E., Aszódi, A., Bengtsson, T., Berna, A., et Fässler, R. (2001). Functional consequences of integrin gene mutations in mice. *Circ. Res* 89, 211-223.
- Brakebusch, C., Bouvard, D., Stanchi, F., Sakai, T., et Fässler, R. (2002). Integrins in invasive growth. *J. Clin. Invest* 109, 999-1006.
- Brooks, P. C., Montgomery, A. M., Rosenfeld, M., Reisfeld, R. A., Hu, T., Klier, G., et Cheresh, D. A. (1994). Integrin alpha v beta 3 antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels. *Cell* 79, 1157-1164.
- Brouard, S., Otterbein, L. E., Anrather, J., Tobiasch, E., Bach, F. H., Choi, A. M., et Soares, M. P. (2000). Carbon monoxide generated by heme oxygenase 1 suppresses endothelial cell apoptosis. *J. Exp. Med* 192, 1015-1026.
- Broussard, J. A., Webb, D. J., et Kaverina, I. (2008). Asymmetric focal adhesion disassembly in motile cells. *Curr. Opin. Cell Biol* 20, 85-90.
- Bubici, C., Papa, S., Pham, C. G., Zazzeroni, F., et Franzoso, G. (2006). The NF-kappaB-mediated control of ROS and JNK signaling. *Histol. Histopathol* 21, 69-80.
- Bulavin, D. V., Phillips, C., Nannenga, B., Timofeev, O., Donehower, L. A., Anderson, C. W., Appella, E., et Fornace, A. J. (2004). Inactivation of the Wip1 phosphatase inhibits mammary tumorigenesis through p38 MAPK-mediated activation of the p16(Ink4a)-p19(Arf) pathway. *Nat. Genet* 36, 343-350.
- Burridge, K., Turner, C. E., et Romer, L. H. (1992). Tyrosine phosphorylation of paxillin and pp125FAK accompanies cell adhesion to extracellular matrix: a role in cytoskeletal assembly. *J. Cell Biol* 119, 893-903.
- Byrne, G. W., McCurry, K. R., Martin, M. J., McClellan, S. M., Platt, J. L., et Logan, J. S. (1997). Transgenic pigs expressing human CD59 and decay-accelerating factor produce an intrinsic barrier to complement-mediated damage. *Transplantation* 63, 149-155.
- Byzova, T. V., Goldman, C. K., Pampori, N., Thomas, K. A., Bett, A., Shattil, S. J., et Plow, E. F. (2000). A mechanism for modulation of cellular responses to VEGF: activation of the integrins. *Mol. Cell* 6, 851-860.
- Byzova, T. V., Rabbani, R., D'Souza, S. E., et Plow, E. F. (1998). Role of integrin alpha(v)beta3 in vascular biology. *Thromb. Haemost* 80, 726-734.
- Calzada, M. J., Alvarez, M. V., et Gonzalez-Rodriguez, J. (2002). Agonist-specific structural rearrangements of integrin alpha IIb beta 3. Confirmation of the bent conformation in platelets at rest and after activation. *J. Biol. Chem* 277, 39899-39908.
- Campana, W. M., Myers, R. R., et Rearden, A. (2003). Identification of PINCH in Schwann cells and DRG neurons: shuttling and signaling after nerve injury. *Glia* 41, 213-223.
- Candinas, D., Lesnikoski, B. A., Robson, S. C., Miyatake, T., Scesney, S. M., Marsh, H. C., Ryan, U. S., Dalmaso, A. P., Hancock, W. W., et Bach, F. H. (1996). Effect of repetitive high-dose treatment with soluble complement receptor type 1 and cobra venom factor on discordant xenograft survival. *Transplantation* 62, 336-342.
- Cardone, M. H., Salvesen, G. S., Widmann, C., Johnson, G., et Frisch, S. M. (1997). The regulation of anoikis: MEKK-1 activation requires cleavage by caspases. *Cell* 90, 315-323.

- Carrier, M. F., Laurent, V., Santolini, J., Melki, R., Didry, D., Xia, G. X., Hong, Y., Chua, N. H., et Pantaloni, D. (1997). Actin depolymerizing factor (ADF/cofilin) enhances the rate of filament turnover: implication in actin-based motility. *J. Cell Biol* *136*, 1307-1322.
- Carman, C. V., et Springer, T. A. (2003). Integrin avidity regulation: are changes in affinity and conformation underemphasized? *Curr. Opin. Cell Biol* *15*, 547-556.
- Carmeliet, P., et Collen, D. (2000). Molecular basis of angiogenesis. Role of VEGF and VE-cadherin. *Ann. N. Y. Acad. Sci* *902*, 249-262; discussion 262-264.
- Carmeliet, P., et Jain, R. K. (2000). Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* *407*, 249-257.
- Carmeliet, P. (2005). Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* *438*, 932-936.
- Chellaiah, M., Kizer, N., Silva, M., Alvarez, U., Kwiatkowski, D., et Hruska, K. A. (2000). Gelsolin deficiency blocks podosome assembly and produces increased bone mass and strength. *J. Cell Biol* *148*, 665-678.
- Chen, G., Qian, H., Starzl, T., Sun, H., Garcia, B., Wang, X., Wise, Y., Liu, Y., Xiang, Y., Copeman, L., et al. (2005). Acute rejection is associated with antibodies to non-Gal antigens in baboons using Gal-knockout pig kidneys. *Nat. Med* *11*, 1295-1298.
- Chen, G., Sun, H., Yang, H., Kubelik, D., Garcia, B., Luo, Y., Xiang, Y., Qian, A., Copeman, L., Liu, W., et al. (2006). The role of anti-non-Gal antibodies in the development of acute humoral xenograft rejection of hDAF transgenic porcine kidneys in baboons receiving anti-Gal antibody neutralization therapy. *Transplantation* *81*, 273-283.
- Chen, G., et Goeddel, D. V. (2002). TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science* *296*, 1634-1635.
- Chen, H. C., et Guan, J. L. (1994). Association of focal adhesion kinase with its potential substrate phosphatidylinositol 3-kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* *91*, 10148-10152.
- Chen, H., Huang, X. N., Yan, W., Chen, K., Guo, L., Tummalapali, L., Dedhar, S., St-Arnaud, R., Wu, C., et Sepulveda, J. L. (2005). Role of the integrin-linked kinase/PINCH1/alpha-parvin complex in cardiac myocyte hypertrophy. *Lab. Invest* *85*, 1342-1356.
- Chen, L., et Carter-Su, C. (2004). Adapter protein SH2-B beta undergoes nucleocytoplasmic shuttling: implications for nerve growth factor induction of neuronal differentiation. *Mol. Cell. Biol* *24*, 3633-3647.
- Chhabra, E. S., et Higgs, H. N. (2007). The many faces of actin: matching assembly factors with cellular structures. *Nat. Cell Biol* *9*, 1110-1121.
- Choi, C. K., Vicente-Manzanares, M., Zareno, J., Whitmore, L. A., Mogilner, A., et Horwitz, A. R. (2008). Actin and alpha-actinin orchestrate the assembly and maturation of nascent adhesions in a myosin II motor-independent manner. *Nat. Cell Biol* *10*, 1039-1050.
- Chung, Y. S., Zhang, W. J., Arentson, E., Kingsley, P. D., Palis, J., et Choi, K. (2002). Lineage analysis of the hemangioblast as defined by FLK1 and SCL expression. *Development* *129*, 5511-5520.
- Clarke, D. M., Brown, M. C., LaLonde, D. P., et Turner, C. E. (2004). Phosphorylation of actopaxin regulates cell spreading and migration. *J. Cell Biol* *166*, 901-912.

- Coates, T. D., Watts, R. G., Hartman, R., et Howard, T. H. (1992). Relationship of F-actin distribution to development of polar shape in human polymorphonuclear neutrophils. *J. Cell Biol* *117*, 765-774.
- Contois, L., Akalu, A., et Brooks, P. C. (2009). Integrins as "functional hubs" in the regulation of pathological angiogenesis. *Semin. Cancer Biol* *19*, 318-328.
- Cooper, D. K., Koren, E., et Oriol, R. (1993). Genetically engineered pigs. *Lancet* *342*, 682-683.
- Cooper, D. K. C., Gollackner, B., et Sachs, D. H. (2002). Will the pig solve the transplantation backlog? *Annu. Rev. Med* *53*, 133-147.
- Cooper, J. D., Walker, N. M., Smyth, D. J., Downes, K., Healy, B. C., et Todd, J. A. (2009). Follow-up of 1715 SNPs from the Wellcome Trust Case Control Consortium genome-wide association study in type I diabetes families. *Genes Immun* *10 Suppl 1*, S85-94.
- Cowan, P. J. (2007). Coagulation and the xenograft endothelium. *Xenotransplantation* *14*, 7-12.
- Cowan, P. J., Roussel, J. C., et d'Apice, A. J. F. (2009). The vascular and coagulation issues in xenotransplantation. *Curr Opin Organ Transplant* *14*, 161-167.
- Cowan, P. J., Shinkel, T. A., Fiscaro, N., Godwin, J. W., Bernabéu, C., Almendro, N., Rius, C., Lonie, A. J., Nottle, M. B., Wigley, P. L., et al. (2003). Targeting gene expression to endothelium in transgenic animals: a comparison of the human ICAM-2, PECAM-1 and endoglin promoters. *Xenotransplantation* *10*, 223-231.
- Cozzi, E., Bhatti, F., Schmoeckel, M., Chavez, G., Smith, K. G., Zaidi, A., Bradley, J. R., Thiru, S., Goddard, M., Vial, C., et al. (2000). Long-term survival of nonhuman primates receiving life-supporting transgenic porcine kidney xenografts. *Transplantation* *70*, 15-21.
- Cozzi, E., Tucker, A. W., Langford, G. A., Pino-Chavez, G., Wright, L., O'Connell, M. J., Young, V. J., Lancaster, R., McLaughlin, M., Hunt, K., et al. (1997). Characterization of pigs transgenic for human decay-accelerating factor. *Transplantation* *64*, 1383-1392.
- Curtis, M., Nikolopoulos, S. N., et Turner, C. E. (2002). Actopaxin is phosphorylated during mitosis and is a substrate for cyclin B1/cdc2 kinase. *Biochem. J* *363*, 233-242.
- Daggett, C. W., Yeatman, M., Lodge, A. J., Chen, E. P., Linn, S. S., Gullotto, C., Frank, M. M., Platt, J. L., et Davis, R. D. (1998). Total respiratory support from swine lungs in primate recipients. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg* *115*, 19-27.
- Dalmaso, A. P., Vercellotti, G. M., Platt, J. L., et Bach, F. H. (1991). Inhibition of complement-mediated endothelial cell cytotoxicity by decay-accelerating factor. Potential for prevention of xenograft hyperacute rejection. *Transplantation* *52*, 530-533.
- Daniel, S., Arvelo, M. B., Patel, V. I., Longo, C. R., Shrikhande, G., Shukri, T., Mahiou, J., Sun, D. W., Mottley, C., Grey, S. T., et al. (2004). A20 protects endothelial cells from TNF-, Fas-, and NK-mediated cell death by inhibiting caspase 8 activation. *Blood* *104*, 2376-2384.
- Dausset J., Ivanyi P., and Ivanyi D. (1965). Tissues Allo-Antigens in humans : Identification of a Complex System (Hu-1). *Histo compatibility Testing* *51 -62*. Copenhagen : Ejnar Munksgaard.
- Davies, W. A., et Stossel, T. P. (1977). Peripheral hyaline blebs (podosomes) of macrophages. *J. Cell Biol* *75*, 941-955.

- Davila, E., Byrne, G. W., LaBreche, P. T., McGregor, H. C. J., Schwab, A. K., Davies, W. R., Rao, V. P., Oi, K., Tazelaar, H. D., Logan, J. S., et al. (2006). T-cell responses during pig-to-primate xenotransplantation. *Xenotransplantation* 13, 31-40.
- Dehoux, J., et Gianello, P. (2009). Accommodation and antibodies. *Transpl. Immunol* 21, 106-110.
- Dehoux, J., de la Parra, B., Latinne, D., Bazin, H., et Gianello, P. (2002). Characterization of baboon anti-porcine IgG antibodies during acute vascular rejection of porcine kidney xenograft. *Xenotransplantation* 9, 338-349.
- Delikouras, A., Hayes, M., Malde, P., Lechler, R. I., et Dorling, A. (2001). Nitric oxide-mediated expression of Bcl-2 and Bcl-x1 and protection from tumor necrosis factor-alpha-mediated apoptosis in porcine endothelial cells after exposure to low concentrations of xenoreactive natural antibody. *Transplantation* 71, 599-605.
- Deng, J. T., Van Lierop, J. E., Sutherland, C., et Walsh, M. P. (2001). Ca²⁺-independent smooth muscle contraction. a novel function for integrin-linked kinase. *J. Biol. Chem* 276, 16365-16373.
- DeRosier, D. J., et Tilney, L. G. (2000). F-actin bundles are derivatives of microvilli: What does this tell us about how bundles might form? *J. Cell Biol* 148, 1-6.
- DesMarais, V., Ichetovkin, I., Condeelis, J., et Hitchcock-DeGregori, S. E. (2002). Spatial regulation of actin dynamics: a tropomyosin-free, actin-rich compartment at the leading edge. *J. Cell. Sci* 115, 4649-4660.
- Dhe-Paganon, S., Werner, E. D., Nishi, M., Hansen, L., Chi, Y., et Shoelson, S. E. (2004). A phenylalanine zipper mediates APS dimerization. *Nat. Struct. Mol. Biol* 11, 968-974.
- Di Paolo, G., Pellegrini, L., Letinic, K., Cestra, G., Zoncu, R., Voronov, S., Chang, S., Guo, J., Wenk, M. R., et De Camilli, P. (2002). Recruitment and regulation of phosphatidylinositol phosphate kinase type 1 gamma by the FERM domain of talin. *Nature* 420, 85-89.
- Diakonova, M., Gunter, D. R., Herrington, J., et Carter-Su, C. (2002). SH2-Bbeta is a Rac-binding protein that regulates cell motility. *J. Biol. Chem* 277, 10669-10677.
- Diamond, L. E., Quinn, C. M., Martin, M. J., Lawson, J., Platt, J. L., et Logan, J. S. (2001). A human CD46 transgenic pig model system for the study of discordant xenotransplantation. *Transplantation* 71, 132-142.
- Dorling, A., Jordan, W., Brookes, P., Delikouras, A., et Lechler, R. I. (2001). "Accommodated" pig endothelial cells promote nitric oxide-dependent Th-2 cytokine responses from human T cells. *Transplantation* 72, 1597-1602.
- Dorling, A., Lombardi, G., Binns, R., et Lechler, R. I. (1996a). Detection of primary direct and indirect human anti-porcine T cell responses using a porcine dendritic cell population. *Eur. J. Immunol* 26, 1378-1387.
- Dorling, A., Stocker, C., Tsao, T., Haskard, D. O., et Lechler, R. I. (1996b). In vitro accommodation of immortalized porcine endothelial cells: resistance to complement mediated lysis and down-regulation of VCAM expression induced by low concentrations of polyclonal human IgG antipig antibodies. *Transplantation* 62, 1127-1136.
- Egan, K., et FitzGerald, G. A. (2006). Eicosanoids and the vascular endothelium. *Handb Exp Pharmacol*, 189-211.

- Eliceiri, B. P., et Cheresh, D. A. (2001). Adhesion events in angiogenesis. *Curr. Opin. Cell Biol* 13, 563-568.
- Eliceiri, B. P., et Cheresh, D. A. (2000). Role of alpha v integrins during angiogenesis. *Cancer J* 6 *Suppl* 3, S245-249.
- Eliceiri, B. P., Paul, R., Schwartzberg, P. L., Hood, J. D., Leng, J., et Cheresh, D. A. (1999). Selective requirement for Src kinases during VEGF-induced angiogenesis and vascular permeability. *Mol. Cell* 4, 915-924.
- Elliott, R. B., Escobar, L., Garkavenko, O., Croxson, M. C., Schroeder, B. A., McGregor, M., Ferguson, G., Beckman, N., et Ferguson, S. (2000). No evidence of infection with porcine endogenous retrovirus in recipients of encapsulated porcine islet xenografts. *Cell Transplant* 9, 895-901.
- Elliott, R. B., Escobar, L., Tan, P. L. J., Muzina, M., Zwain, S., et Buchanan, C. (2007). Live encapsulated porcine islets from a type 1 diabetic patient 9.5 yr after xenotransplantation. *Xenotransplantation* 14, 157-161.
- Enestein, J., Waleh, N. S., et Kramer, R. H. (1992). Basic FGF and TGF-beta differentially modulate integrin expression of human microvascular endothelial cells. *Exp. Cell Res* 203, 499-503.
- Etienne-Manneville, S., et Hall, A. (2002). Rho GTPases in cell biology. *Nature* 420, 629-635.
- Fässler, R., Rohwedel, J., Maltsev, V., Bloch, W., Lentini, S., Guan, K., Gullberg, D., Hescheler, J., Addicks, K., et Wobus, A. M. (1996). Differentiation and integrity of cardiac muscle cells are impaired in the absence of beta 1 integrin. *J. Cell. Sci* 109 (Pt 13), 2989-2999.
- Feng, D., Nagy, J. A., Pyne, K., Dvorak, H. F., et Dvorak, A. M. (1998). Neutrophils emigrate from venules by a transendothelial cell pathway in response to FMLP. *J. Exp. Med* 187, 903-915.
- Ferran, C., Stroka, D. M., Badrichani, A. Z., Cooper, J. T., Wrighton, C. J., Soares, M., Grey, S. T., et Bach, F. H. (1998). A20 inhibits NF-kappaB activation in endothelial cells without sensitizing to tumor necrosis factor-mediated apoptosis. *Blood* 91, 2249-2258.
- Fincham, V. J., James, M., Frame, M. C., et Winder, S. J. (2000). Active ERK/MAP kinase is targeted to newly forming cell-matrix adhesions by integrin engagement and v-Src. *EMBO J* 19, 2911-2923.
- Fink, J. S., Schumacher, J. M., Ellias, S. L., Palmer, E. P., Saint-Hilaire, M., Shannon, K., Penn, R., Starr, P., VanHorne, C., Kott, H. S., et al. (2000). Porcine xenografts in Parkinson's disease and Huntington's disease patients: preliminary results. *Cell Transplant* 9, 273-278.
- Fitau, J., Boulday, G., Coulon, F., Quillard, T., et Charreau, B. (2006). 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. *J. Biol. Chem* 281, 20148-20159.
- Florey (1966). The endothelial cell. *Br Med J* 2, 487-490.
- Fortini, M. E. (2002). Gamma-secretase-mediated proteolysis in cell-surface-receptor signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol* 3, 673-684.
- Franco, S. J., et Huttenlocher, A. (2005). Regulating cell migration: calpains make the cut. *J. Cell. Sci*

118, 3829-3838.

- Frangogiannis, N. G. (2006). Targeting the inflammatory response in healing myocardial infarcts. *Curr. Med. Chem* 13, 1877-1893.
- Frelinger, A. L., Cohen, I., Plow, E. F., Smith, M. A., Roberts, J., Lam, S. C., et Ginsberg, M. H. (1990). Selective inhibition of integrin function by antibodies specific for ligand-occupied receptor conformers. *J. Biol. Chem* 265, 6346-6352.
- Friedrich, E. B., Liu, E., Sinha, S., Cook, S., Milstone, D. S., MacRae, C. A., Mariotti, M., Kuhlencordt, P. J., Force, T., Rosenzweig, A., et al. (2004). Integrin-linked kinase regulates endothelial cell survival and vascular development. *Mol. Cell. Biol* 24, 8134-8144.
- Friedrich, E. B., Sinha, S., Li, L., Dedhar, S., Force, T., Rosenzweig, A., et Gerszten, R. E. (2002). Role of integrin-linked kinase in leukocyte recruitment. *J. Biol. Chem* 277, 16371-16375.
- Frisch, S. M., et Ruoslahti, E. (1997). Integrins and anoikis. *Curr. Opin. Cell Biol* 9, 701-706.
- Frisch, S. M., Vuori, K., Kelaita, D., et Sicks, S. (1996). A role for Jun-N-terminal kinase in anoikis; suppression by bcl-2 and crmA. *J. Cell Biol* 135, 1377-1382.
- Fukuda, T., Chen, K., Shi, X., et Wu, C. (2003). PINCH-1 is an obligate partner of integrin-linked kinase (ILK) functioning in cell shape modulation, motility, and survival. *J. Biol. Chem* 278, 51324-51333.
- Furchgott, R. F., et Zawadzki, J. V. (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288, 373-376.
- Galili, U. (1993). Interaction of the natural anti-Gal antibody with alpha-galactosyl epitopes: a major obstacle for xenotransplantation in humans. *Immunol. Today* 14, 480-482.
- Gateva, V., Sandling, J. K., Hom, G., Taylor, K. E., Chung, S. A., Sun, X., Ortmann, W., Kosoy, R., Ferreira, R. C., Nordmark, G., et al. (2009). A large-scale replication study identifies TNIP1, PRDM1, JAZF1, UHRF1BP1 and IL10 as risk loci for systemic lupus erythematosus. *Nat. Genet* 41, 1228-1233.
- Geiger, B., Bershadsky, A., Pankov, R., et Yamada, K. M. (2001). Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix--cytoskeleton crosstalk. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol* 2, 793-805.
- Geiger, B., et Bershadsky, A. (2002). Exploring the neighborhood: adhesion-coupled cell mechanosensors. *Cell* 110, 139-142.
- Gerritsen, M. E. (1987). Functional heterogeneity of vascular endothelial cells. *Biochem. Pharmacol* 36, 2701-2711.
- Gery, S., Cao, Q., Gueller, S., Xing, H., Tefferi, A., et Koeffler, H. P. (2009). Lnk inhibits myeloproliferative disorder-associated JAK2 mutant, JAK2V617F. *J. Leukoc. Biol* 85, 957-965.
- Gery, S., Gueller, S., Chumakova, K., Kawamata, N., Liu, L., et Koeffler, H. P. (2007). Adaptor protein Lnk negatively regulates the mutant MPL, MPLW515L associated with myeloproliferative disorders. *Blood* 110, 3360-3364.
- Gewaltig, M. T., et Kojda, G. (2002). Vasoprotection by nitric oxide: mechanisms and therapeutic potential. *Cardiovasc. Res* 55, 250-260.

- Giancotti, F. G., et Ruoslahti, E. (1990). Elevated levels of the alpha 5 beta 1 fibronectin receptor suppress the transformed phenotype of Chinese hamster ovary cells. *Cell* 60, 849-859.
- Giannone, G., Dubin-Thaler, B. J., Rossier, O., Cai, Y., Chaga, O., Jiang, G., Beaver, W., Döbereiner, H., Freund, Y., Borisy, G., et al. (2007). Lamellipodial actin mechanically links myosin activity with adhesion-site formation. *Cell* 128, 561-575.
- Gilmore, A. P., et Burridge, K. (1996). Regulation of vinculin binding to talin and actin by phosphatidyl-inositol-4-5-bisphosphate. *Nature* 381, 531-535.
- Gimbrone, M. A., Cotran, R. S., et Folkman, J. (1973). Endothelial regeneration: studies with human endothelial cells in culture. *Ser Haematol* 6, 453-455.
- Godwin, J. W., Fisicaro, N., d'Apice, A. J. F., et Cowan, P. J. (2006). Towards endothelial cell-specific transgene expression in pigs: characterization of the pig ICAM-2 promoter. *Xenotransplantation* 13, 514-521.
- Gollackner, B., Goh, S. K., Qawi, I., Buhler, L., Knosalla, C., Daniel, S., Kaczmarek, E., Awwad, M., Cooper, D. K. C., et Robson, S. C. (2004). Acute vascular rejection of xenografts: roles of natural and elicited xenoreactive antibodies in activation of vascular endothelial cells and induction of procoagulant activity. *Transplantation* 77, 1735-1741.
- Gollackner, B., Mueller, N. J., Houser, S., Qawi, I., Soizic, D., Knosalla, C., Buhler, L., Dor, F. J. M. F., Awwad, M., Sachs, D. H., et al. (2003). Porcine cytomegalovirus and coagulopathy in pig-to-primate xenotransplantation. *Transplantation* 75, 1841-1847.
- Gourlay, W. A., Chambers, W. H., Monaco, A. P., et Maki, T. (1998). Importance of natural killer cells in the rejection of hamster skin xenografts. *Transplantation* 65, 727-734.
- Groth, C. G., Korsgren, O., Tibell, A., Tollemar, J., Möller, E., Bolinder, J., Ostman, J., Reinholt, F. P., Hellerström, C., et Andersson, A. (1994). Transplantation of porcine fetal pancreas to diabetic patients. *Lancet* 344, 1402-1404.
- Gudbjartsson, D. F., Bjornsdottir, U. S., Halapi, E., Helgadottir, A., Sulem, P., Jonsdottir, G. M., Thorleifsson, G., Helgadottir, H., Steinthorsdottir, V., Stefansson, H., et al. (2009). Sequence variants affecting eosinophil numbers associate with asthma and myocardial infarction. *Nat. Genet* 41, 342-347.
- Guillou, H., Depraz-Depland, A., Planus, E., Vianay, B., Chaussy, J., Grichine, A., Albigès-Rizo, C., et Block, M. R. (2008). Lamellipodia nucleation by filopodia depends on integrin occupancy and downstream Rac1 signaling. *Exp. Cell Res* 314, 478-488.
- Gupton, S. L., et Waterman-Storer, C. M. (2006). Spatiotemporal feedback between actomyosin and focal-adhesion systems optimizes rapid cell migration. *Cell* 125, 1361-1374.
- Hancock, W. W. (1997). Impact of alloimmunity on chronic tissue remodelling: role of cytokines and protective genes in the vessel wall. *Transplant Immunology* 5, 277-281.
- Hanks, S. K., Ryzhova, L., Shin, N., et Brábek, J. (2003). Focal adhesion kinase signaling activities and their implications in the control of cell survival and motility. *Front. Biosci* 8, d982-996.
- Hannigan, G. E., Leung-Hagesteijn, C., Fitz-Gibbon, L., Coppelino, M. G., Radeva, G., Filmus, J., Bell, J. C., et Dedhar, S. (1996). Regulation of cell adhesion and anchorage-dependent growth by a new beta 1-integrin-linked protein kinase. *Nature* 379, 91-96.

- Hauet, T., Goujon, J. M., et Vandewalle, A. (2001). To what extent can limiting cold ischaemia/reperfusion injury prevent delayed graft function? *Nephrol. Dial. Transplant* *16*, 1982-1985.
- Hellström, M., Phng, L., Hofmann, J. J., Wallgard, E., Coultas, L., Lindblom, P., Alva, J., Nilsson, A., Karlsson, L., Gaiano, N., et al. (2007). Dll4 signalling through Notch1 regulates formation of tip cells during angiogenesis. *Nature* *445*, 776-780.
- Hering, B. J., Wijkstrom, M., Graham, M. L., Hårdstedt, M., Aasheim, T. C., Jie, T., Ansite, J. D., Nakano, M., Cheng, J., Li, W., et al. (2006). Prolonged diabetes reversal after intraportal xenotransplantation of wild-type porcine islets in immunosuppressed nonhuman primates. *Nat. Med* *12*, 301-303.
- Hiratochi, M., Nagase, H., Kuramochi, Y., Koh, C., Ohkawara, T., et Nakayama, K. (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*, 912-922.
- Hofmann, A., Kessler, B., Ewerling, S., Kabermann, A., Brem, G., Wolf, E., et Pfeifer, A. (2006). Epigenetic regulation of lentiviral transgene vectors in a large animal model. *Mol. Ther* *13*, 59-66.
- Hofmann, J. J., et Luisa Iruela-Arispe, M. (2007). Notch expression patterns in the retina: An eye on receptor-ligand distribution during angiogenesis. *Gene Expr. Patterns* *7*, 461-470.
- Honda, S., Shirotani-Ikejima, H., Tadokoro, S., Maeda, Y., Kinoshita, T., Tomiyama, Y., et Miyata, T. (2009). Integrin-linked kinase associated with integrin activation. *Blood* *113*, 5304-5313.
- Hood, J. D., et Cheresch, D. A. (2002). Role of integrins in cell invasion and migration. *Nat. Rev. Cancer* *2*, 91-100.
- Houser, S. L., Kuwaki, K., Knosalla, C., Dor, F. J. M. F., Gollackner, B., Cheng, J., Shimizu, A., Schuurman, H., et Cooper, D. K. C. (2004). Thrombotic microangiopathy and graft arteriopathy in pig hearts following transplantation into baboons. *Xenotransplantation* *11*, 416-425.
- Hu, Y., Benedict, M. A., Ding, L., et Núñez, G. (1999). Role of cytochrome c and dATP/ATP hydrolysis in Apaf-1-mediated caspase-9 activation and apoptosis. *EMBO J* *18*, 3586-3595.
- Huang, X., Li, Y., Tanaka, K., Moore, K. G., et Hayashi, J. I. (1995). Cloning and characterization of Lnk, a signal transduction protein that links T-cell receptor activation signal to phospholipase C gamma 1, Grb2, and phosphatidylinositol 3-kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* *92*, 11618-11622.
- Humphries, J. D., Byron, A., et Humphries, M. J. (2006). Integrin ligands at a glance. *J. Cell. Sci* *119*, 3901-3903.
- Hunt, K. A., Zhernakova, A., Turner, G., Heap, G. A. R., Franke, L., Bruinenberg, M., Romanos, J., Dinesen, L. C., Ryan, A. W., Panesar, D., et al. (2008). Newly identified genetic risk variants for celiac disease related to the immune response. *Nat. Genet* *40*, 395-402.
- Hynes, R. O. (2002). Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* *110*, 673-687.
- Iden, S., et Collard, J. G. (2008). Crosstalk between small GTPases and polarity proteins in cell

- polarization. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol* 9, 846-859.
- Ilić, D., Furuta, Y., Kanazawa, S., Takeda, N., Sobue, K., Nakatsuji, N., Nomura, S., Fujimoto, J., Okada, M., et Yamamoto, T. (1995). Reduced cell motility and enhanced focal adhesion contact formation in cells from FAK-deficient mice. *Nature* 377, 539-544.
- Iseki, M., Kubo, C., Kwon, S., Yamaguchi, A., Kataoka, Y., Yoshida, N., Takatsu, K., et Takaki, S. (2004). Increased numbers of B-1 cells and enhanced responses against TI-2 antigen in mice lacking APS, an adaptor molecule containing PH and SH2 domains. *Mol. Cell. Biol* 24, 2243-2250.
- Iseki, M., Kubo-Akashi, C., Kwon, S., Yamaguchi, A., Takatsu, K., et Takaki, S. (2005). APS, an adaptor molecule containing PH and SH2 domains, has a negative regulatory role in B cell proliferation. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 330, 1005-1013.
- Iso, T., Hamamori, Y., et Kedes, L. (2003a). Notch signaling in vascular development. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol* 23, 543-553.
- Iso, T., Kedes, L., et Hamamori, Y. (2003b). HES and HERP families: multiple effectors of the Notch signaling pathway. *J. Cell. Physiol* 194, 237-255.
- Jaboulay M. Greffe de rein au pli du coude par sutures artérielles et veineuses. *Lyon M* 1906 ; 107 : 575-77
- Jaffe, A. B., et Hall, A. (2005). RHO GTPASES: Biochemistry and Biology. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 21, 247-269.
- Jaffe, E. A., Nachman, R. L., Becker, C. G., et Minick, C. R. (1973). Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J. Clin. Invest* 52, 2745-2756.
- Jain, R. K. (2003). Molecular regulation of vessel maturation. *Nat. Med* 9, 685-693.
- Joutel, A., Andreux, F., Gaulis, S., Domenga, V., Cecillon, M., Battail, N., Piga, N., Chapon, F., Godfrain, C., et Tournier-Lasserre, E. (2000). The ectodomain of the Notch3 receptor accumulates within the cerebrovasculature of CADASIL patients. *J. Clin. Invest* 105, 597-605.
- Kamei, N., Kwon, S., Alev, C., Ishikawa, M., Yokoyama, A., Nakanishi, K., Yamada, K., Horii, M., Nishimura, H., Takaki, S., et al. (2010). Lnk deletion reinforces the function of bone marrow progenitors in promoting neovascularization and astrogliosis following spinal cord injury. *Stem Cells* 28, 365-375.
- Kano, Y., Katoh, K., Masuda, M., et Fujiwara, K. (1996). Macromolecular composition of stress fiber-plasma membrane attachment sites in endothelial cells in situ. *Circ. Res* 79, 1000-1006.
- Kao, H. Y., Ordentlich, P., Koyano-Nakagawa, N., Tang, Z., Downes, M., Kintner, C. R., Evans, R. M., et Kadesch, T. (1998). A histone deacetylase corepressor complex regulates the Notch signal transduction pathway. *Genes Dev* 12, 2269-2277.
- Karsan, A., Yee, E., et Harlan, J. M. (1996). Endothelial cell death induced by tumor necrosis factor- α is inhibited by the Bcl-2 family member, A1. *J. Biol. Chem* 271, 27201-27204.
- Karsan, A. (2005). The role of notch in modeling and maintaining the vasculature. *Can. J. Physiol. Pharmacol* 83, 14-23.

- Kato, Y., Iwama, A., Tadokoro, Y., Shimoda, K., Minoguchi, M., Akira, S., Tanaka, M., Miyajima, A., Kitamura, T., et Nakauchi, H. (2005). Selective activation of STAT5 unveils its role in stem cell self-renewal in normal and leukemic hematopoiesis. *J. Exp. Med* 202, 169-179.
- Kawano, Y., Fukata, Y., Oshiro, N., Amano, M., Nakamura, T., Ito, M., Matsumura, F., Inagaki, M., et Kaibuchi, K. (1999). Phosphorylation of myosin-binding subunit (MBS) of myosin phosphatase by Rho-kinase in vivo. *J. Cell Biol* 147, 1023-1038.
- Khwaja, A., Rodriguez-Viciana, P., Wennström, S., Warne, P. H., et Downward, J. (1997). Matrix adhesion and Ras transformation both activate a phosphoinositide 3-OH kinase and protein kinase B/Akt cellular survival pathway. *EMBO J* 16, 2783-2793.
- Kinashi, T. (2005). Intracellular signalling controlling integrin activation in lymphocytes. *Nat. Rev. Immunol* 5, 546-559.
- Klein, E. A., Yung, Y., Castagnino, P., Kothapalli, D., et Assoian, R. K. (2007). Cell adhesion, cellular tension, and cell cycle control. *Meth. Enzymol* 426, 155-175.
- Komoda, H., Miyagawa, S., Omori, T., Takahagi, Y., Murakami, H., Shigehisa, T., Ito, T., Matsuda, H., et Shirakura, R. (2005). Survival of adult islet grafts from transgenic pigs with N-acetylglucosaminyltransferase-III (GnT-III) in cynomolgus monkeys. *Xenotransplantation* 12, 209-216.
- Komori, K., et Vanhoutte, P. M. (1990). Endothelium-derived hyperpolarizing factor. *Blood Vessels* 27, 238-245.
- Kong, M., Wang, C. S., et Donoghue, D. J. (2002). Interaction of fibroblast growth factor receptor 3 and the adapter protein SH2-B. A role in STAT5 activation. *J. Biol. Chem* 277, 15962-15970.
- Korenbaum, E., Olski, T. M., et Noegel, A. A. (2001). Genomic organization and expression profile of the parvin family of focal adhesion proteins in mice and humans. *Gene* 279, 69-79.
- Kotani, K., Wilden, P., et Pillay, T. S. (1998). SH2-B α is an insulin-receptor adapter protein and substrate that interacts with the activation loop of the insulin-receptor kinase. *Biochem. J* 335 (Pt 1), 103-109.
- Kourilsky, P., Chaouat, G., Rabourdin-Combe, C., et Claverie, J. M. (1987). Working principles in the immune system implied by the "peptidic self" model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 84, 3400-3404.
- Kroshus, T. J., Bolman, R. M., et Dalmaso, A. P. (1996). Selective IgM depletion prolongs organ survival in an ex vivo model of pig-to-human xenotransplantation. *Transplantation* 62, 5-12.
- Kubo-Akashi, C., Iseki, M., Kwon, S., Takizawa, H., Takatsu, K., et Takaki, S. (2004). Roles of a conserved family of adaptor proteins, Lnk, SH2-B, and APS, for mast cell development, growth, and functions: APS-deficiency causes augmented degranulation and reduced actin assembly. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 315, 356-362.
- Kurzer, J. H., Saharinen, P., Silvennoinen, O., et Carter-Su, C. (2006). Binding of SH2-B family members within a potential negative regulatory region maintains JAK2 in an active state. *Mol. Cell. Biol* 26, 6381-6394.
- Kuwaki, K., Tseng, Y., Dor, F. J. M. F., Shimizu, A., Houser, S. L., Sanderson, T. M., Lantos, C. J., Prabharasuth, D. D., Cheng, J., Moran, K., et al. (2005). Heart transplantation in baboons

- using alpha1,3-galactosyltransferase gene-knockout pigs as donors: initial experience. *Nat. Med* *11*, 29-31.
- Kwon, S., Suzuki, T., Kawamoto, A., Ii, M., Eguchi, M., Akimaru, H., Wada, M., Matsumoto, T., Masuda, H., Nakagawa, Y., et al. (2009). Pivotal role of lnk adaptor protein in endothelial progenitor cell biology for vascular regeneration. *Circ. Res* *104*, 969-977.
- Lachmann, P. J. (1991). The control of homologous lysis. *Immunology Today* *12*, 312-315.
- Lagutina, I., Lazzari, G., Duchi, R., Turini, P., Tessaro, I., Brunetti, D., Colleoni, S., Crotti, G., et Galli, C. (2007). Comparative aspects of somatic cell nuclear transfer with conventional and zona-free method in cattle, horse, pig and sheep. *Theriogenology* *67*, 90-98.
- Lai, L., Kolber-Simonds, D., Park, K., Cheong, H., Greenstein, J. L., Im, G., Samuel, M., Bonk, A., Rieke, A., Day, B. N., et al. (2002). Production of alpha-1,3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning. *Science* *295*, 1089-1092.
- LaLonde, D. P., Brown, M. C., Bouverat, B. P., et Turner, C. E. (2005). Actopaxin interacts with TESK1 to regulate cell spreading on fibronectin. *J. Biol. Chem* *280*, 21680-21688.
- Lamallice, L., Le Boeuf, F., et Huot, J. (2007). Endothelial cell migration during angiogenesis. *Circ. Res* *100*, 782-794.
- Lammert, E., Brown, J., et Melton, D. A. (2000). Notch gene expression during pancreatic organogenesis. *Mech. Dev* *94*, 199-203.
- Lange, A., Wickstrom, S. A., Jakobson, M., Zent, R., Sainio, K., et Fassler, R. (2009). Integrin-linked kinase is an adaptor with essential functions during mouse development. *Nature* *461*, 1002-1006.
- Langford, G. A., Yannoutsos, N., Cozzi, E., Lancaster, R., Elsome, K., Chen, P., Richards, A., et White, D. J. (1994). Production of pigs transgenic for human decay accelerating factor. *Transplant. Proc* *26*, 1400-1401.
- Laukaitis, C. M., Webb, D. J., Donais, K., et Horwitz, A. F. (2001). Differential dynamics of alpha 5 integrin, paxillin, and alpha-actinin during formation and disassembly of adhesions in migrating cells. *J. Cell Biol* *153*, 1427-1440.
- Laumonier, T., Mohacsi, P. J., Matozan, K. M., Banz, Y., Haeberli, A., Korchagina, E. Y., Bovin, N. V., Vanhove, B., et Rieben, R. (2004). Endothelial cell protection by dextran sulfate: a novel strategy to prevent acute vascular rejection in xenotransplantation. *Am. J. Transplant* *4*, 181-187.
- Le Bas-Bernardet, S., Anegon, I., et Blanco, G. (2008). Progress and prospects: genetic engineering in xenotransplantation. *Gene Ther* *15*, 1247-1256.
- Le Clainche, C., et Carlier, M. (2008). Regulation of actin assembly associated with protrusion and adhesion in cell migration. *Physiol. Rev* *88*, 489-513.
- Lee, E. G., Boone, D. L., Chai, S., Libby, S. L., Chien, M., Lodolce, J. P., et Ma, A. (2000). Failure to regulate TNF-induced NF-kappaB and cell death responses in A20-deficient mice. *Science* *289*, 2350-2354.
- Lee, J. O., Rieu, P., Arnaout, M. A., et Liddington, R. (1995). Crystal structure of the A domain from the alpha subunit of integrin CR3 (CD11b/CD18). *Cell* *80*, 631-638.

- Legate, K. R., Montañez, E., Kudlacek, O., et Fässler, R. (2006). ILK, PINCH and parvin: the tIPP of integrin signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol* 7, 20-31.
- Lenschow, D. J., Zeng, Y., Thistlethwaite, J. R., Montag, A., Brady, W., Gibson, M. G., Linsley, P. S., et Bluestone, J. A. (1992). Long-term survival of xenogeneic pancreatic islet grafts induced by CTLA4lg. *Science* 257, 789-792.
- Leong, K. G., Hu, X., Li, L., Nosedá, M., Larrivé, B., Hull, C., Hood, L., Wong, F., et Karsan, A. (2002). Activated Notch4 inhibits angiogenesis: role of beta 1-integrin activation. *Mol. Cell. Biol* 22, 2830-2841.
- Leong, K. G., et Karsan, A. (2006). Recent insights into the role of Notch signaling in tumorigenesis. *Blood* 107, 2223-2233.
- Leventhal, J. R., Dalmaso, A. P., Cromwell, J. W., Platt, J. L., Manivel, C. J., Bolman, R. M., et Matas, A. J. (1993). Prolongation of cardiac xenograft survival by depletion of complement. *Transplantation* 55, 857-865; discussion 865-866.
- Levy, D., Ehret, G. B., Rice, K., Verwoert, G. C., Launer, L. J., Dehghan, A., Glazer, N. L., Morrison, A. C., Johnson, A. D., Aspelund, T., et al. (2009). Genome-wide association study of blood pressure and hypertension. *Nat. Genet.* Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gate2.inist.fr/pubmed/19430479> [Accédé Juillet 1, 2010].
- Levy, M. F., Crippin, J., Sutton, S., Netto, G., McCormack, J., Curiel, T., Goldstein, R. M., Newman, J. T., Gonwa, T. A., Bancheau, J., et al. (2000). Liver allotransplantation after extracorporeal hepatic support with transgenic (hCD55/hCD59) porcine livers: clinical results and lack of pig-to-human transmission of the porcine endogenous retrovirus. *Transplantation* 69, 272-280.
- Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M. I., et Nourshargh, S. (2007). Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat. Rev. Immunol* 7, 678-689.
- Li, M., Li, Z., Morris, D. L., et Rui, L. (2007). Identification of SH2B2beta as an inhibitor for SH2B1- and SH2B2alpha-promoted Janus kinase-2 activation and insulin signaling. *Endocrinology* 148, 1615-1621.
- Li, M., Ren, D., Iseki, M., Takaki, S., et Rui, L. (2006). Differential role of SH2-B and APS in regulating energy and glucose homeostasis. *Endocrinology* 147, 2163-2170.
- Li, S., Bordoy, R., Stanchi, F., Moser, M., Braun, A., Kudlacek, O., Wewer, U. M., Yurchenco, P. D., et Fässler, R. (2005a). PINCH1 regulates cell-matrix and cell-cell adhesions, cell polarity and cell survival during the peri-implantation stage. *J. Cell. Sci* 118, 2913-2921.
- Li, S., Huang, N. F., et Hsu, S. (2005b). Mechanotransduction in endothelial cell migration. *J. Cell. Biochem* 96, 1110-1126.
- Li, Y., He, X., Schembri-King, J., Jakes, S., et Hayashi, J. (2000). Cloning and characterization of human Lnk, an adaptor protein with pleckstrin homology and Src homology 2 domains that can inhibit T cell activation. *J. Immunol* 164, 5199-5206.
- Liang, X., Zhou, Q., Li, X., Sun, Y., Lu, M., Dalton, N., Ross, J., et Chen, J. (2005). PINCH1 plays an essential role in early murine embryonic development but is dispensable in ventricular cardiomyocytes. *Mol. Cell. Biol* 25, 3056-3062.
- Lilienfeld, B. G., Garcia-Borges, C., Crew, M. D., et Seebach, J. D. (2006). Porcine UL16-binding

- protein 1 expressed on the surface of endothelial cells triggers human NK cytotoxicity through NKG2D. *J. Immunol* 177, 2146-2152.
- Lin, Y., Soares, M. P., Sato, K., Csizmadia, E., Robson, S. C., Smith, N., et Bach, F. H. (2000). Long-term survival of hamster hearts in presensitized rats. *J. Immunol* 164, 4883-4892.
- Lin, Y., Soares, M. P., Sato, K., Takigami, K., Csizmadia, E., Smith, N., et Bach, F. H. (1999). Accommodated xenografts survive in the presence of anti-donor antibodies and complement that precipitate rejection of naive xenografts. *J. Immunol* 163, 2850-2857.
- Lindner, V., Booth, C., Prudovsky, I., Small, D., Maciag, T., et Liaw, L. (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, 875-883.
- Linnekin, D. (1999). Early signaling pathways activated by c-Kit in hematopoietic cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol* 31, 1053-1074.
- Liu, J., DeYoung, S. M., Hwang, J. B., O'Leary, E. E., et Saltiel, A. R. (2003). The roles of Cbl-b and c-Cbl in insulin-stimulated glucose transport. *J. Biol. Chem* 278, 36754-36762.
- Liu, J., Kimura, A., Baumann, C. A., et Saltiel, A. R. (2002). APS facilitates c-Cbl tyrosine phosphorylation and GLUT4 translocation in response to insulin in 3T3-L1 adipocytes. *Mol. Cell. Biol* 22, 3599-3609.
- Liu, Z., Wang, F., et Chen, X. (2008). Integrin $\alpha\beta$ 3-Targeted Cancer Therapy. *Drug Dev Res* 69, 329-339.
- Liu, Z., Shirakawa, T., Li, Y., Soma, A., Oka, M., Dotto, G. P., Fairman, R. M., Velazquez, O. C., et Herlyn, M. (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, 14-25.
- Logeat, F., Bessia, C., Brou, C., LeBail, O., Jarriault, S., Seidah, N. G., et Israël, A. (1998). The Notch1 receptor is cleaved constitutively by a furin-like convertase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 95, 8108-8112.
- Loirand, G., Guérin, P., et Pacaud, P. (2006). Rho kinases in cardiovascular physiology and pathophysiology. *Circ. Res* 98, 322-334.
- Longo, C. R., Arvelo, M. B., Patel, V. I., Daniel, S., Mahiou, J., Grey, S. T., et Ferran, C. (2003). A20 protects from CD40-CD40 ligand-mediated endothelial cell activation and apoptosis. *Circulation* 108, 1113-1118.
- Lückhoff, A., et Clapham, D. E. (1992). Inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate activates an endothelial $\text{Ca}(2+)$ -permeable channel. *Nature* 355, 356-358.
- Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C., et Wang, X. (1998). Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 94, 481-490.
- Lusis, A. J. (2000). Atherosclerosis. *Nature* 407, 233-241.
- Lynch, D. K., Ellis, C. A., Edwards, P. A., et Hiles, I. D. (1999). Integrin-linked kinase regulates phosphorylation of serine 473 of protein kinase B by an indirect mechanism. *Oncogene* 18, 8024-8032.

- MacKenzie, F., Duriez, P., Larrivée, B., Chang, L., Pollet, I., Wong, F., Yip, C., et Karsan, A. (2004). Notch4-induced inhibition of endothelial sprouting requires the ankyrin repeats and involves signaling through RBP-Jkappa. *Blood* *104*, 1760-1768.
- Madri, J. A., Pratt, B. M., et Tucker, A. M. (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*, 1375-1384.
- Maekawa, M., Ishizaki, T., Boku, S., Watanabe, N., Fujita, A., Iwamatsu, A., Obinata, T., Ohashi, K., Mizuno, K., et Narumiya, S. (1999). Signaling from Rho to the actin cytoskeleton through protein kinases ROCK and LIM-kinase. *Science* *285*, 895-898.
- Magee, J. C., Collins, B. H., Harland, R. C., Lindman, B. J., Bollinger, R. R., Frank, M. M., et Platt, J. L. (1995). Immunoglobulin prevents complement-mediated hyperacute rejection in swine-to-primate xenotransplantation. *J. Clin. Invest* *96*, 2404-2412.
- Maher, S. E., Karmann, K., Min, W., Hughes, C. C., Pober, J. S., et Bothwell, A. L. (1996). Porcine endothelial CD86 is a major costimulator of xenogeneic human T cells: cloning, sequencing, and functional expression in human endothelial cells. *J. Immunol* *157*, 3838-3844.
- Mallavarapu, A., et Mitchison, T. (1999). Regulated actin cytoskeleton assembly at filopodium tips controls their extension and retraction. *J. Cell Biol* *146*, 1097-1106.
- Mañes, S., Mira, E., Gómez-Mouton, C., Zhao, Z. J., Lacalle, R. A., et Martínez-A, C. (1999). Concerted activity of tyrosine phosphatase SHP-2 and focal adhesion kinase in regulation of cell motility. *Mol. Cell. Biol* *19*, 3125-3135.
- Martin, C., Plat, M., Nerrière-Daguin, V., Coulon, F., Uzbekova, S., Venturi, E., Condé, F., Hermel, J., Hantraye, P., Tesson, L., et al. (2005). Transgenic expression of CTLA4-Ig by fetal pig neurons for xenotransplantation. *Transgenic Res* *14*, 373-384.
- Martin, M. U., et Wesche, H. (2002). Summary and comparison of the signaling mechanisms of the Toll/interleukin-1 receptor family. *Biochim. Biophys. Acta* *1592*, 265-280.
- Martin, U., Winkler, M. E., Id, M., Radeke, H., Arseniev, L., Takeuchi, Y., Simon, A. R., Patience, C., Haverich, A., et Steinhoff, G. (2000). Productive infection of primary human endothelial cells by pig endogenous retrovirus (PERV). *Xenotransplantation* *7*, 138-142.
- Massberg, S., et Messmer, K. (1998). The nature of ischemia/reperfusion injury. *Transplant. Proc* *30*, 4217-4223.
- Maures, T. J., Kurzer, J. H., et Carter-Su, C. (2007). SH2B1 (SH2-B) and JAK2: a multifunctional adaptor protein and kinase made for each other. *Trends Endocrinol. Metab* *18*, 38-45.
- McEver, R. P., Beckstead, J. H., Moore, K. L., Marshall-Carlson, L., et Bainton, D. F. (1989). GMP-140, a platelet alpha-granule membrane protein, is also synthesized by vascular endothelial cells and is localized in Weibel-Palade bodies. *J. Clin. Invest* *84*, 92-99.
- McGregor, C. G. A., Davies, W. R., Oi, K., Teotia, S. S., Schirmer, J. M., Risdahl, J. M., Tazelaar, H. D., Kremers, W. K., Walker, R. C., Byrne, G. W., et al. (2005). Cardiac xenotransplantation: recent preclinical progress with 3-month median survival. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg* *130*, 844-851.
- Mejillano, M. R., Kojima, S., Applewhite, D. A., Gertler, F. B., Svitkina, T. M., et Borisov, G. G.

- (2004). Lamellipodial versus filopodial mode of the actin nanomachinery: pivotal role of the filament barbed end. *Cell* 118, 363-373.
- Mills, J., Digicaylioglu, M., Legg, A. T., Young, C. E., Young, S. S., Barr, A. M., Fletcher, L., O'Connor, T. P., et Dedhar, S. (2003). Role of integrin-linked kinase in nerve growth factor-stimulated neurite outgrowth. *J. Neurosci* 23, 1638-1648.
- Minami, A., Iseki, M., Kishi, K., Wang, M., Ogura, M., Furukawa, N., Hayashi, S., Yamada, M., Obata, T., Takeshita, Y., et al. (2003). Increased insulin sensitivity and hypoinsulinemia in APS knockout mice. *Diabetes* 52, 2657-2665.
- Mitra, S. K., Hanson, D. A., et Schlaepfer, D. D. (2005). Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol* 6, 56-68.
- Miwa, Y., Kobayashi, T., Nagasaka, T., Liu, D., Yu, M., Yokoyama, I., Suzuki, A., et Nakao, A. (2004). Are N-glycolylneuraminic acid (Hanganutziu-Deicher) antigens important in pig-to-human xenotransplantation? *Xenotransplantation* 11, 247-253.
- Miyamoto, S., Akiyama, S. K., et Yamada, K. M. (1995). Synergistic roles for receptor occupancy and aggregation in integrin transmembrane function. *Science* 267, 883-885.
- Mohiuddin, M. M., Ogawa, H., Yin, D., Shen, J., et Galili, U. (2003). Antibody-mediated accommodation of heart grafts expressing an incompatible carbohydrate antigen. *Transplantation* 75, 258-262.
- Moissoglu, K., et Schwartz, M. A. (2006). Integrin signalling in directed cell migration. *Biol. Cell* 98, 547-555.
- Montanez, E., Wickström, S. A., Altstätter, J., Chu, H., et Fässler, R. (2009). Alpha-parvin controls vascular mural cell recruitment to vessel wall by regulating RhoA/ROCK signalling. *EMBO J* 28, 3132-3144.
- Moodie, S. A., Alleman-Sposeto, J., et Gustafson, T. A. (1999). Identification of the APS protein as a novel insulin receptor substrate. *J. Biol. Chem* 274, 11186-11193.
- Moreau, V., Tatin, F., Varon, C., et Génot, E. (2003). Actin can reorganize into podosomes in aortic endothelial cells, a process controlled by Cdc42 and RhoA. *Mol. Cell. Biol* 23, 6809-6822.
- Morgan, B. P., Berg, C. W., et Harris, C. L. (2005). "Homologous restriction" in complement lysis: roles of membrane complement regulators. *Xenotransplantation* 12, 258-265.
- Morris, D. L., Cho, K. W., et Rui, L. (2010). Critical Role of the Src Homology 2 (SH2) Domain of Neuronal SH2B1 in the Regulation of Body Weight and Glucose Homeostasis in Mice. *Endocrinology*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gate2.inist.fr/pubmed/20484460> [Accédé Juin 10, 2010].
- Morris, D. L., Cho, K. W., Zhou, Y., et Rui, L. (2009). SH2B1 enhances insulin sensitivity by both stimulating the insulin receptor and inhibiting tyrosine dephosphorylation of insulin receptor substrate proteins. *Diabetes* 58, 2039-2047.
- Mukoyama, Y., Hara, T., Xu, M., Tamura, K., Donovan, P. J., Kim, H., Kogo, H., Tsuji, K., Nakahata, T., et Miyajima, A. (1998). In vitro expansion of murine multipotential hematopoietic progenitors from the embryonic aorta-gonad-mesonephros region. *Immunity* 8, 105-114.

- Murányi, A., MacDonald, J. A., Deng, J. T., Wilson, D. P., Haystead, T. A. J., Walsh, M. P., Erdodi, F., Kiss, E., Wu, Y., et Hartshorne, D. J. (2002). Phosphorylation of the myosin phosphatase target subunit by integrin-linked kinase. *Biochem. J* 366, 211-216.
- Naumanen, P., Lappalainen, P., et Hotulainen, P. (2008). Mechanisms of actin stress fibre assembly. *J Microsc* 231, 446-454.
- Nelms, K., O'Neill, T. J., Li, S., Hubbard, S. R., Gustafson, T. A., et Paul, W. E. (1999). Alternative splicing, gene localization, and binding of SH2-B to the insulin receptor kinase domain. *Mamm. Genome* 10, 1160-1167.
- Newton-Cheh, C., Johnson, T., Gateva, V., Tobin, M. D., Bochud, M., Coin, L., Najjar, S. S., Zhao, J. H., Heath, S. C., Eyheramendy, S., et al. (2009). Genome-wide association study identifies eight loci associated with blood pressure. *Nat. Genet.* Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gate2.inist.fr/pubmed/19430483> [Accédé Juillet 1, 2010].
- Nikolopoulos, S. N., et Turner, C. E. (2000). Actopaxin, a new focal adhesion protein that binds paxillin LD motifs and actin and regulates cell adhesion. *J. Cell Biol* 151, 1435-1448.
- Nishi, M., Werner, E. D., Oh, B., Frantz, J. D., Dhe-Paganon, S., Hansen, L., Lee, J., et Shoelson, S. E. (2005). Kinase activation through dimerization by human SH2-B. *Mol. Cell. Biol* 25, 2607-2621.
- Nishida, N., Xie, C., Shimaoka, M., Cheng, Y., Walz, T., et Springer, T. A. (2006). Activation of leukocyte beta2 integrins by conversion from bent to extended conformations. *Immunity* 25, 583-594.
- Niu, J., Profirovic, J., Pan, H., Vaiskunaite, R., et Voyno-Yasenetskaya, T. (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, 848-856.
- Nobes, C. D., et Hall, A. (1995). Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* 81, 53-62.
- Nobuhisa, I., Takizawa, M., Takaki, S., Inoue, H., Okita, K., Ueno, M., Takatsu, K., et Taga, T. (2003). Regulation of hematopoietic development in the aorta-gonad-mesonephros region mediated by Lnk adaptor protein. *Mol. Cell. Biol* 23, 8486-8494.
- Nosedá, M., Chang, L., McLean, G., Grim, J. E., Clurman, B. E., Smith, L. L., et Karsan, A. (2004a). Notch activation induces endothelial cell cycle arrest and participates in contact inhibition: role of p21Cip1 repression. *Mol. Cell. Biol* 24, 8813-8822.
- Nosedá, M., McLean, G., Niessen, K., Chang, L., Pollet, I., Montpetit, R., Shahidi, R., Dorovini-Zis, K., Li, L., Beckstead, B., et al. (2004b). Notch activation results in phenotypic and functional changes consistent with endothelial-to-mesenchymal transformation. *Circ. Res* 94, 910-917.
- Obermeier, A., Ahmed, S., Manser, E., Yen, S. C., Hall, C., et Lim, L. (1998). PAK promotes morphological changes by acting upstream of Rac. *EMBO J* 17, 4328-4339.
- O'Brien, K. B., Argetsinger, L. S., Diakonova, M., et Carter-Su, C. (2003). YXXL motifs in SH2-Bbeta are phosphorylated by JAK2, JAK1, and platelet-derived growth factor receptor and are required for membrane ruffling. *J. Biol. Chem* 278, 11970-11978.

- O'Brien, K. B., O'Shea, J. J., et Carter-Su, C. (2002). SH2-B family members differentially regulate JAK family tyrosine kinases. *J. Biol. Chem* 277, 8673-8681.
- Ochoa, G. C., Slepnev, V. I., Neff, L., Ringstad, N., Takei, K., Daniell, L., Kim, W., Cao, H., McNiven, M., Baron, R., et al. (2000). A functional link between dynamin and the actin cytoskeleton at podosomes. *J. Cell Biol* 150, 377-389.
- Ogawa, M., Kizumoto, M., Nishikawa, S., Fujimoto, T., Kodama, H., et Nishikawa, S. I. (1999). Expression of alpha4-integrin defines the earliest precursor of hematopoietic cell lineage diverged from endothelial cells. *Blood* 93, 1168-1177.
- Oh, S. T., Simonds, E. F., Jones, C., Hale, M. B., Goltsev, Y., Gibbs, K. D., Merker, J. D., Zehnder, J. L., Nolan, G. P., et Gotlib, J. (2010). Novel mutations in the inhibitory adaptor protein LNK drive JAK-STAT signaling in patients with myeloproliferative neoplasms. *Blood*.
- Oldmixon, B. A., Wood, J. C., Ericsson, T. A., Wilson, C. A., White-Scharf, M. E., Andersson, G., Greenstein, J. L., Schuurman, H., et Patience, C. (2002). Porcine endogenous retrovirus transmission characteristics of an inbred herd of miniature swine. *J. Virol* 76, 3045-3048.
- Olski, T. M., Noegel, A. A., et Korenbaum, E. (2001). Parvin, a 42 kDa focal adhesion protein, related to the alpha-actinin superfamily. *J. Cell. Sci* 114, 525-538.
- Opipari, A. W., Boguski, M. S., et Dixit, V. M. (1990). The A20 cDNA induced by tumor necrosis factor alpha encodes a novel type of zinc finger protein. *J. Biol. Chem* 265, 14705-14708.
- Osborne, B. A., et Minter, L. M. (2007). Notch signalling during peripheral T-cell activation and differentiation. *Nat Rev Immunol* 7, 64-75.
- Osborne, M. A., Dalton, S., et Kochan, J. P. (1995). The yeast tribrid system--genetic detection of trans-phosphorylated ITAM-SH2-interactions. *Biotechnology (N.Y.)* 13, 1474-1478.
- Parsons, J. T. (2003). Focal adhesion kinase: the first ten years. *J. Cell. Sci* 116, 1409-1416.
- Pasquet, J., Noury, M., et Nurden, A. T. (2002). Evidence that the platelet integrin alphaIIb beta3 is regulated by the integrin-linked kinase, ILK, in a PI3-kinase dependent pathway. *Thromb. Haemost* 88, 115-122.
- Patterson, C. E., et Lum, H. (2001). Update on pulmonary edema: the role and regulation of endothelial barrier function. *Endothelium* 8, 75-105.
- Persad, S., Attwell, S., Gray, V., Mawji, N., Deng, J. T., Leung, D., Yan, J., Sanghera, J., Walsh, M. P., et Dedhar, S. (2001). Regulation of protein kinase B/Akt-serine 473 phosphorylation by integrin-linked kinase: critical roles for kinase activity and amino acids arginine 211 and serine 343. *J. Biol. Chem* 276, 27462-27469.
- Petrache, I., Birukova, A., Ramirez, S. I., Garcia, J. G. N., et Verin, A. D. (2003). The role of the microtubules in tumor necrosis factor-alpha-induced endothelial cell permeability. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol* 28, 574-581.
- Pfaff, M., Liu, S., Erle, D. J., et Ginsberg, M. H. (1998). Integrin beta cytoplasmic domains differentially bind to cytoskeletal proteins. *J. Biol. Chem* 273, 6104-6109.
- Platt, J. L., Vercellotti, G. M., Lindman, B. J., Oegema, T. R., Bach, F. H., et Dalmaso, A. P. (1990). Release of heparan sulfate from endothelial cells. Implications for pathogenesis of hyperacute rejection. *J. Exp. Med* 171, 1363-1368.

- Pober, J. S., et Cotran, R. S. (1990). The role of endothelial cells in inflammation. *Transplantation* 50, 537-544.
- Pober, J. S., Lapierre, L. A., Stolpen, A. H., Brock, T. A., Springer, T. A., Fiers, W., Bevilacqua, M. P., Mendrick, D. L., et Gimbrone, M. A. (1987). Activation of cultured human endothelial cells by recombinant lymphotoxin: comparison with tumor necrosis factor and interleukin 1 species. *J. Immunol* 138, 3319-3324.
- Pober, J. S., et Sessa, W. C. (2007). Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nat. Rev. Immunol* 7, 803-815.
- Pohlman, T. H., et Harlan, J. M. (1989). Human endothelial cell response to lipopolysaccharide, interleukin-1, and tumor necrosis factor is regulated by protein synthesis. *Cell. Immunol* 119, 41-52.
- Pollard, T. D., Blanchoin, L., et Mullins, R. D. (2000). Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 29, 545-576.
- Prasain, N., et Stevens, T. (2009). The actin cytoskeleton in endothelial cell phenotypes. *Microvasc. Res* 77, 53-63.
- Pries, A. R., et Kuebler, W. M. (2006). Normal endothelium. *Handb Exp Pharmacol*, 1-40.
- Puthalakath, H., Huang, D. C., O'Reilly, L. A., King, S. M., et Strasser, A. (1999). The proapoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex. *Mol. Cell* 3, 287-296.
- Puthalakath, H., Villunger, A., O'Reilly, L. A., Beaumont, J. G., Coultas, L., Cheney, R. E., Huang, D. C., et Strasser, A. (2001). Bmf: a proapoptotic BH3-only protein regulated by interaction with the myosin V actin motor complex, activated by anoikis. *Science* 293, 1829-1832.
- Qian, X., Riccio, A., Zhang, Y., et Ginty, D. D. (1998). Identification and characterization of novel substrates of Trk receptors in developing neurons. *Neuron* 21, 1017-1029.
- Quillard, T., Coupel, S., Coulon, F., Fitau, J., Chatelais, M., Cuturi, M. C., Chiffolleau, E., et Charreau, B. (2008). Impaired Notch4 activity elicits endothelial cell activation and apoptosis: implication for transplant arteriosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol* 28, 2258-2265.
- Radley, J. M., et Haller, C. J. (1982). The demarcation membrane system of the megakaryocyte: a misnomer? *Blood* 60, 213-219.
- Raftopoulou, M., et Hall, A. (2004). Cell migration: Rho GTPases lead the way. *Dev. Biol* 265, 23-32.
- Ramirez, P., Chavez, R., Majado, M., Munitiz, V., Muñoz, A., Hernandez, Q., Palenciano, C. G., Pino-Chavez, G., Loba, M., Minguela, A., et al. (2000). Life-supporting human complement regulator decay accelerating factor transgenic pig liver xenograft maintains the metabolic function and coagulation in the nonhuman primate for up to 8 days. *Transplantation* 70, 989-998.
- Ramsoondar, J., Vaught, T., Ball, S., Mendicino, M., Monahan, J., Jobst, P., Vance, A., Duncan, J., Wells, K., et Ayares, D. (2009). Production of transgenic pigs that express porcine endogenous retrovirus small interfering RNAs. *Xenotransplantation* 16, 164-180.
- Rankin, S., et Rozengurt, E. (1994). Platelet-derived growth factor modulation of focal adhesion kinase (p125FAK) and paxillin tyrosine phosphorylation in Swiss 3T3 cells. *Bell-shaped dose*

- response and cross-talk with bombesin. *J. Biol. Chem* 269, 704-710.
- Re, F., Zanetti, A., Sironi, M., Polentarutti, N., Lanfranccone, L., Dejana, E., et Colotta, F. (1994). Inhibition of anchorage-dependent cell spreading triggers apoptosis in cultured human endothelial cells. *J. Cell Biol* 127, 537-546.
- Rearden, A. (1994). A new LIM protein containing an autoepitope homologous to "senescent cell antigen". *Biochem. Biophys. Res. Commun* 201, 1124-1131.
- Ren, D., Li, M., Duan, C., et Rui, L. (2005). Identification of SH2-B as a key regulator of leptin sensitivity, energy balance, and body weight in mice. *Cell Metab* 2, 95-104.
- Rider, L., Tao, J., Snyder, S., Brinley, B., Lu, J., et Diakonova, M. (2009). Adapter protein SH2B1beta cross-links actin filaments and regulates actin cytoskeleton. *Mol. Endocrinol* 23, 1065-1076.
- Ridley, A. J., et Hall, A. (1992). The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* 70, 389-399.
- Riley-Vargas, R. C., Gill, D. B., Kemper, C., Liszewski, M. K., et Atkinson, J. P. (2004). CD46: expanding beyond complement regulation. *Trends in Immunology* 25, 496-503.
- Risau, W., et Flamme, I. (1995). Vasculogenesis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol* 11, 73-91.
- Riveline, D., Zamir, E., Balaban, N. Q., Schwarz, U. S., Ishizaki, T., Narumiya, S., Kam, Z., Geiger, B., et Bershadsky, A. D. (2001). Focal contacts as mechanosensors: externally applied local mechanical force induces growth of focal contacts by an mDial-dependent and ROCK-independent mechanism. *J. Cell Biol* 153, 1175-1186.
- Rogers, C. S., Hao, Y., Rokhlina, T., Samuel, M., Stoltz, D. A., Li, Y., Petroff, E., Vermeer, D. W., Kabel, A. C., Yan, Z., et al. (2008). Production of CFTR-null and CFTR-DeltaF508 heterozygous pigs by adeno-associated virus-mediated gene targeting and somatic cell nuclear transfer. *J. Clin. Invest* 118, 1571-1577.
- Rossman, K. L., Der, C. J., et Sondek, J. (2005). GEF means go: turning on RHO GTPases with guanine nucleotide-exchange factors. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol* 6, 167-180.
- Rottner, K., Hall, A., et Small, J. V. (1999). Interplay between Rac and Rho in the control of substrate contact dynamics. *Curr. Biol* 9, 640-648.
- Roussel, J. C., Moran, C. J., Salvaris, E. J., Nandurkar, H. H., d'Apice, A. J. F., et Cowan, P. J. (2008). Pig thrombomodulin binds human thrombin but is a poor cofactor for activation of human protein C and TAFI. *Am. J. Transplant* 8, 1101-1112.
- Rubanyi, G. M., et Vanhoutte, P. M. (1986). Oxygen-derived free radicals, endothelium, and responsiveness of vascular smooth muscle. *Am. J. Physiol* 250, H815-821.
- Rüegg, C., et Mariotti, A. (2003). Vascular integrins: pleiotropic adhesion and signaling molecules in vascular homeostasis and angiogenesis. *Cell. Mol. Life Sci* 60, 1135-1157.
- Rui, L., et Carter-Su, C. (1998). Platelet-derived growth factor (PDGF) stimulates the association of SH2-Bbeta with PDGF receptor and phosphorylation of SH2-Bbeta. *J. Biol. Chem* 273, 21239-21245.
- Rui, L., Herrington, J., et Carter-Su, C. (1999). SH2-B is required for nerve growth factor-induced neuronal differentiation. *J. Biol. Chem* 274, 10590-10594.

- Rui, L., Mathews, L. S., Hotta, K., Gustafson, T. A., et Carter-Su, C. (1997). Identification of SH2-Bbeta as a substrate of the tyrosine kinase JAK2 involved in growth hormone signaling. *Mol. Cell. Biol* 17, 6633-6644.
- Ruoslahti, E. (1996). RGD and other recognition sequences for integrins. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol* 12, 697-715.
- Rytömaa, M., Martins, L. M., et Downward, J. (1999). Involvement of FADD and caspase-8 signalling in detachment-induced apoptosis. *Curr. Biol* 9, 1043-1046.
- Sachs, D. H., et Galli, C. (2009). Genetic manipulation in pigs. *Curr Opin Organ Transplant* 14, 148-153.
- Sakai, T., Li, S., Docheva, D., Grashoff, C., Sakai, K., Kostka, G., Braun, A., Pfeifer, A., Yurchenco, P. D., et Fässler, R. (2003). Integrin-linked kinase (ILK) is required for polarizing the epiblast, cell adhesion, and controlling actin accumulation. *Genes Dev* 17, 926-940.
- Sakamoto, S., et Kyprianou, N. (2010). Targeting anoikis resistance in prostate cancer metastasis. *Mol. Aspects Med* 31, 205-214.
- Sandrin, M. S., Vaughan, H. A., Dabkowski, P. L., et McKenzie, I. F. (1993). Anti-pig IgM antibodies in human serum react predominantly with Gal(alpha 1-3)Gal epitopes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 90, 11391-11395.
- Sata, M., Saiura, A., Kunisato, A., Tojo, A., Okada, S., Tokuhisa, T., Hirai, H., Makuuchi, M., Hirata, Y., et Nagai, R. (2002). Hematopoietic stem cells differentiate into vascular cells that participate in the pathogenesis of atherosclerosis. *Nat. Med* 8, 403-409.
- Scatena, M., Almeida, M., Chaisson, M. L., Fausto, N., Nicosia, R. F., et Giachelli, C. M. (1998). NF-kappaB mediates alphavbeta3 integrin-induced endothelial cell survival. *J. Cell Biol* 141, 1083-1093.
- Schaapherder, A. F., Daha, M. R., te Bulte, M. T., van der Woude, F. J., et Gooszen, H. G. (1994). Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity against porcine endothelium induced by a majority of human sera. *Transplantation* 57, 1376-1382.
- Schafer, D. A., Jennings, P. B., et Cooper, J. A. (1996). Dynamics of capping protein and actin assembly in vitro: uncapping barbed ends by polyphosphoinositides. *J. Cell Biol* 135, 169-179.
- Schenkel, A. R., Mamdouh, Z., Chen, X., Liebman, R. M., et Muller, W. A. (2002). CD99 plays a major role in the migration of monocytes through endothelial junctions. *Nat. Immunol* 3, 143-150.
- Schmidt, C. E., Horwitz, A. F., Lauffenburger, D. A., et Sheetz, M. P. (1993). Integrin-cytoskeletal interactions in migrating fibroblasts are dynamic, asymmetric, and regulated. *J. Cell Biol* 123, 977-991.
- Schober, M., Raghavan, S., Nikolova, M., Polak, L., Pasolli, H. A., Beggs, H. E., Reichardt, L. F., et Fuchs, E. (2007). Focal adhesion kinase modulates tension signaling to control actin and focal adhesion dynamics. *J. Cell Biol* 176, 667-680.
- Schroeder, C., Allan, J. S., Nguyen, B., Wu, G., Zhang, T., Azimzadeh, A. M., Madsen, J. C., Schuurman, H., Sachs, D. H., et Pierson, R. N. (2005). Hyperacute rejection is attenuated in

- GalT knockout swine lungs perfused ex vivo with human blood. *Transplant. Proc* 37, 512-513.
- Seita, J., Ema, H., Ooehara, J., Yamazaki, S., Tadokoro, Y., Yamasaki, A., Eto, K., Takaki, S., Takatsu, K., et Nakauchi, H. (2007). Lnk negatively regulates self-renewal of hematopoietic stem cells by modifying thrombopoietin-mediated signal transduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 104, 2349-2354.
- Sepulveda, J. L., et Wu, C. (2006). The parvins. *Cell. Mol. Life Sci* 63, 25-35.
- Séveno, C., Fellous, M., Ashton-Chess, J., Soulillou, J., et Vanhove, B. (2005). [On the acceptability of xenografts]. *Med Sci (Paris)* 21, 302-308.
- Shattil, S. J., et Newman, P. J. (2004). Integrins: dynamic scaffolds for adhesion and signaling in platelets. *Blood* 104, 1606-1615.
- Shimizu, A., Yamada, K., Yamamoto, S., Lavelle, J. M., Barth, R. N., Robson, S. C., Sachs, D. H., et Colvin, R. B. (2005). Thrombotic microangiopathic glomerulopathy in human decay accelerating factor-transgenic swine-to-baboon kidney xenografts. *J. Am. Soc. Nephrol* 16, 2732-2745.
- Shyy, J. Y., et Chien, S. (2002). Role of integrins in endothelial mechanosensing of shear stress. *Circ. Res* 91, 769-775.
- Simon, C., Dondi, E., Chaix, A., de Sepulveda, P., Kubiseski, T. J., Varin-Blank, N., et Velazquez, L. (2008). Lnk adaptor protein down-regulates specific Kit-induced signaling pathways in primary mast cells. *Blood* 112, 4039-4047.
- Simpson, C. D., Anyiwe, K., et Schimmer, A. D. (2008). Anoikis resistance and tumor metastasis. *Cancer Lett* 272, 177-185.
- Slack, C., Werz, C., Wieser, D., Alic, N., Foley, A., Stocker, H., Withers, D. J., Thornton, J. M., Hafen, E., et Partridge, L. (2010). Regulation of lifespan, metabolism, and stress responses by the *Drosophila* SH2B protein, Lnk. *PLoS Genet* 6, e1000881.
- Small, J. V., Stradal, T., Vignat, E., et Rottner, K. (2002). The lamellipodium: where motility begins. *Trends Cell Biol* 12, 112-120.
- Soares, M. P., Lin, Y., Sato, K., Stuhlmeier, K. M., et Bach, F. H. (1999). Accommodation. *Immunol. Today* 20, 434-437.
- Soares, M. P., et Bach, F. H. (2007). Heme oxygenase-1 in organ transplantation. *Front. Biosci* 12, 4932-4945.
- Soares, M. P., Seldon, M. P., Gregoire, I. P., Vassilevskaia, T., Berberat, P. O., Yu, J., Tsui, T., et Bach, F. H. (2004). Heme oxygenase-1 modulates the expression of adhesion molecules associated with endothelial cell activation. *J. Immunol* 172, 3553-3563.
- Soin, B., Smith, K. G., Zaidi, A., Cozzi, E., Bradley, J. R., Ostlie, D. J., Lockhart, A., White, D. J., et Friend, P. J. (2001). Physiological aspects of pig-to-primate renal xenotransplantation. *Kidney Int* 60, 1592-1597.
- Stanchi, F., Grashoff, C., Nguemeni Yonga, C. F., Grall, D., Fässler, R., et Van Obberghen-Schilling, E. (2009). Molecular dissection of the ILK-PINCH-parvin triad reveals a fundamental role for the ILK kinase domain in the late stages of focal-adhesion maturation. *J. Cell. Sci* 122, 1800-1811.

- Stevens, T., Garcia, J. G., Shasby, D. M., Bhattacharya, J., et Malik, A. B. (2000). Mechanisms regulating endothelial cell barrier function. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol* *279*, L419-422.
- Stroka, D. M., Badrichani, A. Z., Bach, F. H., et Ferran, C. (1999). Overexpression of A1, an NF-kappaB-inducible anti-apoptotic bcl gene, inhibits endothelial cell activation. *Blood* *93*, 3803-3810.
- Strömblad, S., Becker, J. C., Yebra, M., Brooks, P. C., et Cheresh, D. A. (1996). Suppression of p53 activity and p21WAF1/CIP1 expression by vascular cell integrin alphaVbeta3 during angiogenesis. *J. Clin. Invest* *98*, 426-433.
- Stupack, D. G., Puente, X. S., Boutsaboualoy, S., Storgard, C. M., et Cheresh, D. A. (2001). Apoptosis of adherent cells by recruitment of caspase-8 to unligated integrins. *J. Cell Biol* *155*, 459-470.
- Suchting, S., Freitas, C., le Noble, F., Benedito, R., Bréant, C., Duarte, A., et Eichmann, A. (2007). The Notch ligand Delta-like 4 negatively regulates endothelial tip cell formation and vessel branching. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* *104*, 3225-3230.
- Sugiura, T., Kato, Y., Kubo, Y., et Tsuji, A. (2006). Mutation in an adaptor protein PDZK1 affects transport activity of organic cation transporter OCTNs and oligopeptide transporter PEPT2. *Drug Metab. Pharmacokinet* *21*, 375-383.
- Suhr, B. D., Black, S. M., Guzman-Paz, M., Matas, A. J., et Dalmasso, A. P. (2007). Inhibition of the membrane attack complex of complement for induction of accommodation in the hamster-to-rat heart transplant model. *Xenotransplantation* *14*, 572-579.
- Svitkina, T. M., et Borisy, G. G. (1999). Arp2/3 complex and actin depolymerizing factor/cofilin in dendritic organization and treadmilling of actin filament array in lamellipodia. *J. Cell Biol* *145*, 1009-1026.
- Svitkina, T. M., Verkhovskiy, A. B., McQuade, K. M., et Borisy, G. G. (1997). Analysis of the actin-myosin II system in fish epidermal keratocytes: mechanism of cell body translocation. *J. Cell Biol* *139*, 397-415.
- Sykes, M., d'Apice, A., et Sandrin, M. (2003). Position paper of the Ethics Committee of the International Xenotransplantation Association. *Xenotransplantation* *10*, 194-203.
- Tadokoro, S., Shattil, S. J., Eto, K., Tai, V., Liddington, R. C., de Pereda, J. M., Ginsberg, M. H., et Calderwood, D. A. (2003). Talin binding to integrin beta tails: a final common step in integrin activation. *Science* *302*, 103-106.
- Taguchi, A., Soma, T., Tanaka, H., Kanda, T., Nishimura, H., Yoshikawa, H., Tsukamoto, Y., Iso, H., Fujimori, Y., Stern, D. M., et al. (2004). Administration of CD34+ cells after stroke enhances neurogenesis via angiogenesis in a mouse model. *J. Clin. Invest* *114*, 330-338.
- Takagi, J., et Springer, T. A. (2002). Integrin activation and structural rearrangement. *Immunol. Rev* *186*, 141-163.
- Takaki, S., Sauer, K., Iritani, B. M., Chien, S., Ebihara, Y., Tsuji, K., Takatsu, K., et Perlmutter, R. M. (2000). Control of B cell production by the adaptor protein lnk. Definition Of a conserved family of signal-modulating proteins. *Immunity* *13*, 599-609.
- Takaki, S., Watts, J. D., Forbush, K. A., Nguyen, N. T., Hayashi, J., Alberola-Ila, J., Aebbersold, R., et

- Perlmutter, R. M. (1997). Characterization of Lnk. An adaptor protein expressed in lymphocytes. *J. Biol. Chem* 272, 14562-14570.
- Takaki, S., Morita, H., Tezuka, Y., et Takatsu, K. (2002). Enhanced hematopoiesis by hematopoietic progenitor cells lacking intracellular adaptor protein, Lnk. *J. Exp. Med* 195, 151-160.
- Takaki, S., Tezuka, Y., Sauer, K., Kubo, C., Kwon, S., Armstead, E., Nakao, K., Katsuki, M., Perlmutter, R. M., et Takatsu, K. (2003). Impaired lymphopoiesis and altered B cell subpopulations in mice overexpressing Lnk adaptor protein. *J. Immunol* 170, 703-710.
- Takenawa, T., et Miki, H. (2001). WASP and WAVE family proteins: key molecules for rapid rearrangement of cortical actin filaments and cell movement. *J. Cell. Sci* 114, 1801-1809.
- Takenawa, T., et Suetsugu, S. (2007). The WASP-WAVE protein network: connecting the membrane to the cytoskeleton. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol* 8, 37-48.
- Takizawa, H., Eto, K., Yoshikawa, A., Nakauchi, H., Takatsu, K., et Takaki, S. (2008). Growth and maturation of megakaryocytes is regulated by Lnk/Sh2b3 adaptor protein through crosstalk between cytokine- and integrin-mediated signals. *Exp. Hematol* 36, 897-906.
- Takizawa, H., Kubo-Akashi, C., Nobuhisa, I., Kwon, S., Iseki, M., Taga, T., Takatsu, K., et Takaki, S. (2006). Enhanced engraftment of hematopoietic stem/progenitor cells by the transient inhibition of an adaptor protein, Lnk. *Blood* 107, 2968-2975.
- Takizawa, H., Nishimura, S., Takayama, N., Oda, A., Nishikii, H., Morita, Y., Kakinuma, S., Yamazaki, S., Okamura, S., Tamura, N., et al. (2010). Lnk regulates integrin alphaIIb beta3 outside-in signaling in mouse platelets, leading to stabilization of thrombus development in vivo. *J. Clin. Invest* 120, 179-190.
- Tan, C., Cruet-Hennequart, S., Troussard, A., Fazli, L., Costello, P., Sutton, K., Wheeler, J., Gleave, M., Sanghera, J., et Dedhar, S. (2004). Regulation of tumor angiogenesis by integrin-linked kinase (ILK). *Cancer Cell* 5, 79-90.
- Tarone, G., Cirillo, D., Giancotti, F. G., Comoglio, P. M., et Marchisio, P. C. (1985). Rous sarcoma virus-transformed fibroblasts adhere primarily at discrete protrusions of the ventral membrane called podosomes. *Exp. Cell Res* 159, 141-157.
- Tavassoli, M., et Aoki, M. (1989). Localization of megakaryocytes in the bone marrow. *Blood Cells* 15, 3-14.
- Theriot, J. A., et Mitchison, T. J. (1991). Actin microfilament dynamics in locomoting cells. *Nature* 352, 126-131.
- Thomas, G. J., Lewis, M. P., Hart, I. R., Marshall, J. F., et Speight, P. M. (2001). AlphaVbeta6 integrin promotes invasion of squamous carcinoma cells through up-regulation of matrix metalloproteinase-9. *Int. J. Cancer* 92, 641-650.
- Thurston, G., Rudge, J. S., Ioffe, E., Zhou, H., Ross, L., Croll, S. D., Glazer, N., Holash, J., McDonald, D. M., et Yancopoulos, G. D. (2000). Angiopoietin-1 protects the adult vasculature against plasma leakage. *Nat. Med* 6, 460-463.
- Tilney, L. G., et Kallenbach, N. (1979). Polymerization of actin. VI. The polarity of the actin filaments in the acrosomal process and how it might be determined. *J. Cell Biol* 81, 608-623.
- Tong, W., Zhang, J., et Lodish, H. F. (2005). Lnk inhibits erythropoiesis and Epo-dependent JAK2

activation and downstream signaling pathways. *Blood* 105, 4604-4612.

- Tran, P. D., Christiansen, D., Winterhalter, A., Brooks, A., Gorrell, M., Lilienfeld, B. G., Seebach, J. D., Sandrin, M., et Sharland, A. (2008). Porcine cells express more than one functional ligand for the human lymphocyte activating receptor NKG2D. *Xenotransplantation* 15, 321-332.
- Troussard, A. A., Mawji, N. M., Ong, C., Mui, A., St -Arnaud, R., et Dedhar, S. (2003). Conditional knock-out of integrin-linked kinase demonstrates an essential role in protein kinase B/Akt activation. *J. Biol. Chem* 278, 22374-22378.
- Tsai, S., Fero, J., et Bartelmez, S. (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, 950-957.
- Tu, Y., Huang, Y., Zhang, Y., Hua, Y., et Wu, C. (2001). A new focal adhesion protein that interacts with integrin-linked kinase and regulates cell adhesion and spreading. *J. Cell Biol* 153, 585-598.
- Tuckwell, D. S., et Humphries, M. J. (1997). A structure prediction for the ligand-binding region of the integrin beta subunit: evidence for the presence of a von Willebrand factor A domain. *FEBS Lett* 400, 297-303.
- Turer, A. T., et Hill, J. A. (2010). Pathogenesis of myocardial ischemia-reperfusion injury and rationale for therapy. *Am. J. Cardiol* 106, 360-368.
- Turner, C. E., Glenney, J. R., et Burridge, K. (1990). Paxillin: a new vinculin-binding protein present in focal adhesions. *J. Cell Biol* 111, 1059-1068.
- Turner, R. R., Beckstead, J. H., Warnke, R. A., et Wood, G. S. (1987). Endothelial cell phenotypic diversity. In situ demonstration of immunologic and enzymatic heterogeneity that correlates with specific morphologic subtypes. *Am. J. Clin. Pathol* 87, 569-575.
- Tzima, E., Irani-Tehrani, M., Kiosses, W. B., Dejana, E., Schultz, D. A., Engelhardt, B., Cao, G., DeLisser, H., et Schwartz, M. A. (2005). A mechanosensory complex that mediates the endothelial cell response to fluid shear stress. *Nature* 437, 426-431.
- Velazquez, L., Cheng, A. M., Fleming, H. E., Furlonger, C., Vesely, S., Bernstein, A., Paige, C. J., et Pawson, T. (2002). Cytokine signaling and hematopoietic homeostasis are disrupted in Lnk-deficient mice. *J. Exp. Med* 195, 1599-1611.
- Vignjevic, D., Kojima, S., Aratyn, Y., Danciu, O., Svitkina, T., et Borisy, G. G. (2006). Role of fascin in filopodial protrusion. *J. Cell Biol* 174, 863-875.
- Vinogradova, O., Velyvis, A., Velyviene, A., Hu, B., Haas, T., Plow, E., et Qin, J. (2002). A structural mechanism of integrin alpha(IIb)beta(3) "inside-out" activation as regulated by its cytoplasmic face. *Cell* 110, 587-597.
- Wakioka, T., Sasaki, A., Mitsui, K., Yokouchi, M., Inoue, A., Komiya, S., et Yoshimura, A. (1999). APS, an adaptor protein containing Pleckstrin homology (PH) and Src homology-2 (SH2) domains inhibits the JAK-STAT pathway in collaboration with c-Cbl. *Leukemia* 13, 760-767.
- Walker, J. L., Fournier, A. K., et Assoian, R. K. (2005). Regulation of growth factor signaling and cell cycle progression by cell adhesion and adhesion-dependent changes in cellular tension. *Cytokine Growth Factor Rev* 16, 395-405.

- Wan, M., Li, Y., Xue, H., Li, Q., et Li, J. (2007). Eicosapentaenoic acid inhibits TNF-alpha-induced Lnk expression in human umbilical vein endothelial cells: involvement of the PI3K/Akt pathway. *J. Nutr. Biochem* 18, 17-22.
- Wang, H., VerHalen, J., Madariaga, M. L., Xiang, S., Wang, S., Lan, P., Oldenburg, P., Sykes, M., et Yang, Y. (2007). Attenuation of phagocytosis of xenogeneic cells by manipulating CD47. *Blood* 109, 836-842.
- Wang, J., et Riedel, H. (1998). Insulin-like growth factor-I receptor and insulin receptor association with a Src homology-2 domain-containing putative adapter. *J. Biol. Chem* 273, 3136-3139.
- Wang, Y. L. (1985). Exchange of actin subunits at the leading edge of living fibroblasts: possible role of treadmilling. *J. Cell Biol* 101, 597-602.
- Waterworth, P. D., Dunning, J., Tolan, M., Cozzi, E., Langford, G., Chavez, G., White, D., et Wallwork, J. (1998). Life-supporting pig-to-baboon heart xenotransplantation. *J. Heart Lung Transplant* 17, 1201-1207.
- Weaver, A. M. (2008). Invadopodia. *Curr. Biol* 18, R362-364.
- Webb, D. J., Donais, K., Whitmore, L. A., Thomas, S. M., Turner, C. E., Parsons, J. T., et Horwitz, A. F. (2004). FAK-Src signalling through paxillin, ERK and MLCK regulates adhesion disassembly. *Nat Cell Biol* 6, 154-161.
- Webster, N. L., Forni, M., Bacci, M. L., Giovannoni, R., Razzini, R., Fantinati, P., Zannoni, A., Fusetti, L., Dalprà, L., Bianco, M. R., et al. (2005). Multi-transgenic pigs expressing three fluorescent proteins produced with high efficiency by sperm mediated gene transfer. *Mol. Reprod. Dev* 72, 68-76.
- Wegner, A., et Engel, J. (1975). Kinetics of the cooperative association of actin to actin filaments. *Biophys. Chem* 3, 215-225.
- Wennerberg, K., Rossman, K. L., et Der, C. J. (2005). The Ras superfamily at a glance. *J. Cell. Sci* 118, 843-846.
- Werz, C., Köhler, K., Hafen, E., et Stocker, H. (2009). The Drosophila SH2B family adaptor Lnk acts in parallel to chico in the insulin signaling pathway. *PLoS Genet* 5, e1000596.
- White, D. E., Cardiff, R. D., Dedhar, S., et Muller, W. J. (2001). Mammary epithelial-specific expression of the integrin-linked kinase (ILK) results in the induction of mammary gland hyperplasias and tumors in transgenic mice. *Oncogene* 20, 7064-7072.
- White, M. F. (1998). The IRS-signaling system: a network of docking proteins that mediate insulin and cytokine action. *Recent Prog. Horm. Res* 53, 119-138.
- Whitelaw, C. B. A., Radcliffe, P. A., Ritchie, W. A., Carlisle, A., Ellard, F. M., Pena, R. N., Rowe, J., Clark, A. J., King, T. J., et Mitrophanous, K. A. (2004). Efficient generation of transgenic pigs using equine infectious anaemia virus (EIAV) derived vector. *FEBS Lett* 571, 233-236.
- von Wichert, G., Haimovich, B., Feng, G., et Sheetz, M. P. (2003). Force-dependent integrin-cytoskeleton linkage formation requires downregulation of focal complex dynamics by Shp2. *EMBO J* 22, 5023-5035.
- Wickström, S. A., Lange, A., Montanez, E., et Fässler, R. (2010). The ILK/PINCH/parvin complex: the kinase is dead, long live the pseudokinase! *EMBO J* 29, 281-291.

- Williams, G. M., Hume, D. M., Hudson, R. P., Morris, P. J., Kano, K., et Milgrom, F. (1968). "Hyperacute" renal-homograft rejection in man. *N. Engl. J. Med* 279, 611-618.
- Wu, Z., Li, Z., et Yang, J. (2008). Transient transgene transmission to piglets by intrauterine insemination of spermatozoa incubated with DNA fragments. *Mol. Reprod. Dev* 75, 26-32.
- Xiao, T., Takagi, J., Collier, B. S., Wang, J., et Springer, T. A. (2004). Structural basis for allostery in integrins and binding to fibrinogen-mimetic therapeutics. *Nature* 432, 59-67.
- Xing, Z., Chen, H. C., Nowlen, J. K., Taylor, S. J., Shalloway, D., et Guan, J. L. (1994). Direct interaction of v-Src with the focal adhesion kinase mediated by the Src SH2 domain. *Mol. Biol. Cell* 5, 413-421.
- Xiong, J. P., Stehle, T., Diefenbach, B., Zhang, R., Dunker, R., Scott, D. L., Joachimiak, A., Goodman, S. L., et Arnaut, M. A. (2001). Crystal structure of the extracellular segment of integrin alpha Vbeta3. *Science* 294, 339-345.
- Xu, W., Baribault, H., et Adamson, E. D. (1998). Vinculin knockout results in heart and brain defects during embryonic development. *Development* 125, 327-337.
- Yabana, N., et Shibuya, M. (2002). Adaptor protein APS binds the NH2-terminal autoinhibitory domain of guanine nucleotide exchange factor Vav3 and augments its activity. *Oncogene* 21, 7720-7729.
- Yamada, K., Yazawa, K., Shimizu, A., Iwanaga, T., Hisashi, Y., Nuhn, M., O'Malley, P., Nobori, S., Vagefi, P. A., Patience, C., et al. (2005). Marked prolongation of porcine renal xenograft survival in baboons through the use of alpha1,3-galactosyltransferase gene-knockout donors and the cotransplantation of vascularized thymic tissue. *Nat. Med* 11, 32-34.
- Yamaji, S., Suzuki, A., Sugiyama, Y., Koide, Y., Yoshida, M., Kanamori, H., Mohri, H., Ohno, S., et Ishigatsubo, Y. (2001). A novel integrin-linked kinase-binding protein, affixin, is involved in the early stage of cell-substrate interaction. *J. Cell Biol* 153, 1251-1264.
- Yamaji, S., Suzuki, A., Kanamori, H., Mishima, W., Takabayashi, M., Fujimaki, K., Tomita, N., Fujisawa, S., Ohno, S., et Ishigatsubo, Y. (2002). Possible role of ILK-affixin complex in integrin-cytoskeleton linkage during platelet aggregation. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 297, 1324-1331.
- Yanagisawa, M., Kurihara, H., Kimura, S., Tomobe, Y., Kobayashi, M., Mitsui, Y., Yazaki, Y., Goto, K., et Masaki, T. (1988). A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 332, 411-415.
- Yang, J. T., Rayburn, H., et Hynes, R. O. (1995). Cell adhesion events mediated by alpha 4 integrins are essential in placental and cardiac development. *Development* 121, 549-560.
- Yang, J. T., Rayburn, H., et Hynes, R. O. (1993). Embryonic mesodermal defects in alpha 5 integrin-deficient mice. *Development* 119, 1093-1105.
- Yang, Y., Guo, L., Blattner, S. M., Mundel, P., Kretzler, M., et Wu, C. (2005). Formation and phosphorylation of the PINCH-1-integrin linked kinase-alpha-parvin complex are important for regulation of renal glomerular podocyte adhesion, architecture, and survival. *J. Am. Soc. Nephrol* 16, 1966-1976.
- Yang, Y., et Sykes, M. (2007). Xenotransplantation: current status and a perspective on the future.

- Nat. Rev. Immunol 7, 519-531.
- Yano, Y., Geibel, J., et Sumpio, B. E. (1996). Tyrosine phosphorylation of pp125FAK and paxillin in aortic endothelial cells induced by mechanical strain. *Am. J. Physiol* 271, C635-649.
- Yaoita, H., Ogawa, K., Maehara, K., et Maruyama, Y. (1998). Attenuation of ischemia/reperfusion injury in rats by a caspase inhibitor. *Circulation* 97, 276-281.
- Yarmola, E. G., et Bubb, M. R. (2006). Profilin: emerging concepts and lingering misconceptions. *Trends Biochem. Sci* 31, 197-205.
- Yoganathan, N., Yee, A., Zhang, Z., Leung, D., Yan, J., Fazli, L., Kojic, D. L., Costello, P. C., Jabali, M., Dedhar, S., et al. (2002). Integrin-linked kinase, a promising cancer therapeutic target: biochemical and biological properties. *Pharmacol. Ther* 93, 233-242.
- Yokouchi, M., Suzuki, R., Masuhara, M., Komiya, S., Inoue, A., et Yoshimura, A. (1997). Cloning and characterization of APS, an adaptor molecule containing PH and SH2 domains that is tyrosine phosphorylated upon B-cell receptor stimulation. *Oncogene* 15, 7-15.
- Yokouchi, M., Wakioka, T., Sakamoto, H., Yasukawa, H., Ohtsuka, S., Sasaki, A., Ohtsubo, M., Valius, M., Inoue, A., Komiya, S., et al. (1999). APS, an adaptor protein containing PH and SH2 domains, is associated with the PDGF receptor and c-Cbl and inhibits PDGF-induced mitogenesis. *Oncogene* 18, 759-767.
- Yoon, K., et Gaiano, N. (2005). Notch signaling in the mammalian central nervous system: insights from mouse mutants. *Nat. Neurosci* 8, 709-715.
- Yousaf, N., Deng, Y., Kang, Y., et Riedel, H. (2001). Four PSM/SH2-B alternative splice variants and their differential roles in mitogenesis. *J. Biol. Chem* 276, 40940-40948.
- Yu, D. H., Qu, C. K., Henegariu, O., Lu, X., et Feng, G. S. (1998). Protein-tyrosine phosphatase Shp-2 regulates cell spreading, migration, and focal adhesion. *J. Biol. Chem* 273, 21125-21131.
- Yu, P. B., Holzknecht, Z. E., Bruno, D., Parker, W., et Platt, J. L. (1996). Modulation of natural IgM binding and complement activation by natural IgG antibodies: a role for IgG anti-Gal alpha1-3Gal antibodies. *J. Immunol* 157, 5163-5168.
- Zaidel-Bar, R., Itzkovitz, S., Ma'ayan, A., Iyengar, R., et Geiger, B. (2007a). Functional atlas of the integrin adhesome. *Nat. Cell Biol* 9, 858-867.
- Zaidel-Bar, R., Milo, R., Kam, Z., et Geiger, B. (2007b). A paxillin tyrosine phosphorylation switch regulates the assembly and form of cell-matrix adhesions. *J. Cell. Sci* 120, 137-148.
- Zambonin-Zallone, A., Teti, A., Carano, A., et Marchisio, P. C. (1988). The distribution of podosomes in osteoclasts cultured on bone laminae: effect of retinol. *J. Bone Miner. Res* 3, 517-523.
- Zamir, E., Katz, B. Z., Aota, S., Yamada, K. M., Geiger, B., et Kam, Z. (1999). Molecular diversity of cell-matrix adhesions. *J. Cell. Sci* 112 (Pt 11), 1655-1669.
- Zeng, L., Sachdev, P., Yan, L., Chan, J. L., Trenkle, T., McClelland, M., Welsh, J., et Wang, L. (2000). Vav3 Mediates Receptor Protein Tyrosine Kinase Signaling, Regulates GTPase Activity, Modulates Cell Morphology, and Induces Cell Transformation. *Mol. Cell. Biol.* 20, 9212-9224.
- Zhang, M., Deng, Y., Tandon, R., Bai, C., et Riedel, H. (2008). Essential role of PSM/SH2-B variants

- in insulin receptor catalytic activation and the resulting cellular responses. *J. Cell. Biochem* *103*, 162-181.
- Zhang, X., Chattopadhyay, A., Ji, Q. S., Owen, J. D., Ruest, P. J., Carpenter, G., et Hanks, S. K. (1999). Focal adhesion kinase promotes phospholipase C-gamma1 activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* *96*, 9021-9026.
- Zhang, Y., Zhu, W., Wang, Y., Liu, X., Jiao, L., Liu, X., Zhang, Z., Lu, C., et He, C. (2006). Interaction of SH2-Bbeta with RET is involved in signaling of GDNF-induced neurite outgrowth. *J. Cell. Sci* *119*, 1666-1676.
- Zhang, Y., Chen, K., Guo, L., et Wu, C. (2002a). Characterization of PINCH-2, a new focal adhesion protein that regulates the PINCH-1-ILK interaction, cell spreading, and migration. *J. Biol. Chem* *277*, 38328-38338.
- Zhang, Y., Chen, K., Tu, Y., Velyvis, A., Yang, Y., Qin, J., et Wu, C. (2002b). Assembly of the PINCH-ILK-CH-ILKBP complex precedes and is essential for localization of each component to cell-matrix adhesion sites. *J. Cell. Sci* *115*, 4777-4786.
- Zhang, Y., Chen, K., Tu, Y., et Wu, C. (2004). Distinct Roles of Two Structurally Closely Related Focal Adhesion Proteins, α -Parvins and β -Parvins, in Regulation of Cell Morphology and Survival. *Journal of Biological Chemistry* *279*:, 41695 -41705.
- Zhu, A., et Hurst, R. (2002). Anti-N-glycolylneuraminic acid antibodies identified in healthy human serum. *Xenotransplantation* *9*, 376-381.

Caractérisation des fonctions régulatrices de la protéine adaptatrice Lnk (SH2B3) dans l'endothélium vasculaire et application pour la prévention du rejet en xénotransplantation

Afin de développer de nouvelles stratégies de prévention du rejet de greffe, il est important d'identifier les mécanismes et les effecteurs de l'activation endothéliale. Dans ce but, nous avons cherché à poursuivre la caractérisation des fonctions de la protéine adaptatrice Lnk (SH2B3) dans la signalisation des cellules endothéliales (CE) vasculaires.

Nous montrons que l'absence de Lnk inhibe la transduction du signal médié par la $\beta 1$ intégrine dans les CE. Au contraire, la surexpression de Lnk entraîne une augmentation du nombre des adhésions focales, qui s'accompagne d'une phosphorylation importante des protéines FAK et paxilline. D'un point de vue fonctionnel, l'expression soutenue de Lnk favorise l'adhésion et l'étalement des CE alors que la migration et l'apoptose par anoïkis sont diminuées. Nous avons également identifié l' α -parvine comme étant une cible moléculaire de Lnk et noté que son inhibition est responsable d'une baisse de la motilité des CE. L'ensemble de ces résultats a mis en évidence l'implication de Lnk dans les processus cellulaires associés à la signalisation des intégrines.

Par ailleurs, nous avons étudié la possibilité d'une application à la xénotransplantation des fonctions anti-inflammatoires de Lnk. Nous avons montré que la surexpression de la protéine Lnk humaine dans des CE porcines, inhibe l'expression de VCAM-1 induite par le TNF α et protège les cellules de la mort cellulaire par anoïkis et de l'apoptose médiée par le TNF α . Ces résultats révèlent le rôle de Lnk dans la cytoprotection des CE.

L'ensemble de ces travaux présente de nouvelles fonctions régulatrices pour Lnk et ouvre des perspectives à la prévention du rejet de xénotgreffe.

Mots-clé : Lnk (SH2B3), endothélium, intégrine, parvine, xénotransplantation

Characterization of Lnk (SH2B3) adaptor protein regulating functions in vascular endothelium and application for preventing graft rejection in xenotransplantation

In order to develop new strategies for preventing graft rejection, it is important to identify mechanisms and actors of endothelial activation. To this aim, we have characterized Lnk (SH2B3) protein functions in vascular endothelial cells (EC) signaling.

We showed that Lnk suppression inhibits $\beta 1$ integrin-mediated signal transduction in EC. By contrast, Lnk overexpression increases the number of focal adhesions and induces the phosphorylation of both FAK and paxillin proteins. Functionally, sustained Lnk expression dramatically increases EC adhesion and spreading, whereas EC migration and apoptosis induced by anoïkis are decreased. Lnk reduces the expression of α -parvine protein that we identified as the molecular target impairing EC migration. Collectively, our results demonstrate the involvement of the adaptor Lnk in integrin-mediated signaling and functions.

In addition, we have studied the potential application of anti-inflammatory effects of Lnk to xenotransplantation. We showed that Lnk overexpression down-regulated VCAM-1 expression mediated by TNF α and protects cells from death by anoïkis and TNF α -mediated apoptosis. These findings reveal a role for Lnk as a cytoprotective molecule.

All together, this study presents new regulatory functions for Lnk and additional insights in the prevention of rejection.