

Notch/Delta-like : la communication wi-fi* des cellules vasculaires

Delphine Ciais, Jean-Jacques Feige

Inserm-CEA-Université Grenoble Alpes,
Laboratoire biologie du cancer et de l'infection, UMR-S 1036,
Institut de recherches en technologies et sciences pour le vivant,
Grenoble, France

<jean-jacques.feige@cea.fr>

*on peut dire aussi « paracrine »

Présentation de la voie de signalisation

Dans le monde du vivant, les cellules qui composent les organismes des plus simples (unicellulaires) aux plus complexes (mammifères), sont comparables à nos téléphones portables en ce sens qu'elles sont capables d'émettre et d'intégrer une multitude de signaux provenant du milieu environnant (hormones, facteurs de croissances diffusibles, médiateurs chimiques, neurotransmetteurs, composants de la matrice extracellulaire...). Chez les organismes pluricellulaires, un système plus élaboré de communication, semblable aux connexions wi-fi de nos téléphones actuels, est utilisé pour communiquer entre cellules voisines. La voie de signalisation Notch/Dll représente un élément majeur de communication wi-fi des cellules vasculaires comme nous allons le voir dans cette courte revue. Chez les mammifères, il existe 4 récepteurs de type Notch (Notch1-4) et 5 ligands transmembranaires (Delta-like ou Dll1, 3, 4, et Jagged1 et 2). Les récepteurs Notch sont des protéines hétéro-dimériques constituées d'un domaine extracellulaire glycosylé associé de manière non covalente à une protéine transmembranaire (figure 1). La liaison d'une protéine de la famille Dll/Jag d'une cellule émettrice à un récepteur Notch d'une cellule avoisinante (cellule réceptrice) induit deux clivages successifs du récepteur Notch par des γ -sécrétases intracellulaires et la libération de son domaine cytoplasmique dénommé NICD (*Notch IntraCellular Domain*) (figure 1). Le domaine NICD est alors transloqué dans le noyau cellulaire où il s'associe avec le « DNA-binding transcription factor » CSL et le co-activateur MAML (*mastermind-like*) pour former un complexe transcriptionnel capable d'induire l'expression des gènes cibles de la voie Notch. Parmi les gènes cibles, on peut noter l'importance des facteurs de

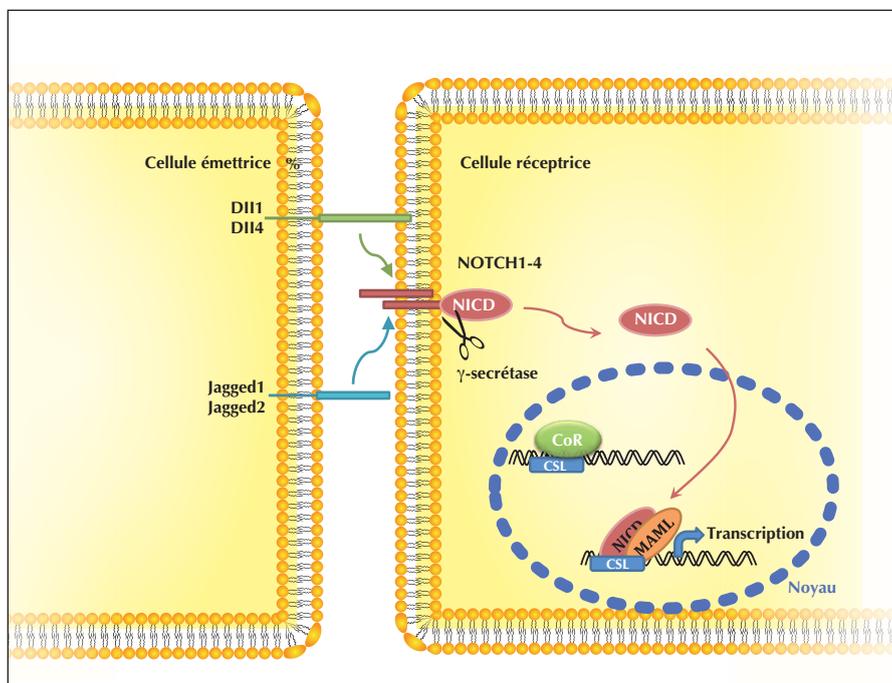


Figure 1. Activation de la voie de signalisation dépendante des récepteurs Notch. La signalisation via les récepteurs Notch est une signalisation intercellulaire. Les ligands (Delta-like 1 ; Delta-like 4, Jagged1 et Jagged2) de la cellule émettrice peuvent engager une interaction avec un récepteur (Notch1,2,3,4) présent sur la cellule réceptrice. Cette interaction induit le clivage de la partie intracellulaire du récepteur Notch (NICD) qui est alors transloquée dans le noyau et s'associe avec des co-activateurs (MAML/CSL) pour former un complexe moléculaire capable d'induire la transcription des gènes cibles.

transcription de la famille Hey/Hes qui régulent et contrôlent la différenciation et la migration cellulaire.

Cette interaction en *trans* (i.e. entre ligands et récepteurs de 2 cellules différentes) est activatrice de la voie de signalisation mais il semble qu'il existe également des interactions en *cis* (ligand et récepteur de la même cellule), potentiellement inhibitrices. Par ailleurs, la modification post-traductionnelle de Notch par des glycosyltransférases de la famille Fringe peut moduler la sélectivité de l'interaction du récepteur avec son ligand et favoriser l'activation par

les ligands de type Delta-like plutôt que par ceux de type Jagged.

Les détails moléculaires de ces mécanismes d'activation et de modulation de la voie de signalisation Notch sont accessibles dans des revues spécialisées [1, 2].

Activation de la voie Notch et système vasculaire

La démonstration de l'importance de la voie Notch dans l'angiogenèse est venue de l'analyse phénotypique des souris invalidées génétiquement pour certains des

acteurs de cette voie. L'inactivation homozygote de Notch1 dans les cellules endothéliales induit la mort embryonnaire des souriceaux du fait de défauts vasculaires et d'angiogenèse [3]. Ces défauts sont amplifiés dans le cas d'une double invalidation Notch1/Notch4, ce qui suggère une certaine redondance dans la fonction de ces deux récepteurs au cours du développement vasculaire [4]. L'invalidation de Notch3 induit, quant à elle, des défauts d'angiogenèse ainsi qu'une forte altération du recouvrement vasculaire par les cellules murales [5]. En fait, l'importance et la spécificité des couples ligands/récepteurs dans le développement vasculaire et l'angiogenèse tient probablement à leurs profils d'expression. Alors que l'expression du récepteur Notch1 est ubiquitaire, l'expression de Notch4 est principalement restreinte aux cellules endothéliales et celle de Notch3 aux cellules de muscle lisse. Pour ce qui est des ligands, Dll1, Dll4 et Jag1 sont exprimés dans les cellules endothéliales. L'analyse des souris invalidées pour Dll4 indique que ce gène est particulièrement important ; en effet, comme pour le VEGF-A, l'inactivation d'un seul allèle (souris hétérozygote) peut, selon le fonds génétique des souris, induire une létalité embryonnaire due à des anomalies de l'angiogenèse développementale [6].

Rôle dans l'artériogenèse (figure 2A)

Ces souris hétérozygotes, dont l'expression de Dll4 est atténuée dans les cellules endothéliales, présentent des malformations artério-veineuses et une perte des marqueurs artériels (EphrinB2), ce qui souligne le rôle de Dll4 dans la différenciation artérielle [7]. Plus tardivement, on a montré que Dll1 semble nécessaire au maintien de l'identité artérielle [8]. De plus, l'artériogenèse consécutive à une ischémie du membre inférieur est totalement déficiente chez les souris adultes hétérozygotes pour le gène Dll1 [3].

Rôle dans la différenciation et la maturation des cellules de muscles lisses (figure 2B)

L'invalidation de Jag1 dans les cellules endothéliales induit un défaut de recouvrement des vaisseaux par les cellules de muscles lisses, similaire à celui identifié lors de l'invalidation de Notch3 [9, 10]. Cela suggère une communication entre cellules endothéliales et cellules murales via l'interaction Jag1/Notch3, requise pour un recouvrement vasculaire correct. Il a été montré *in vitro* que l'activation de

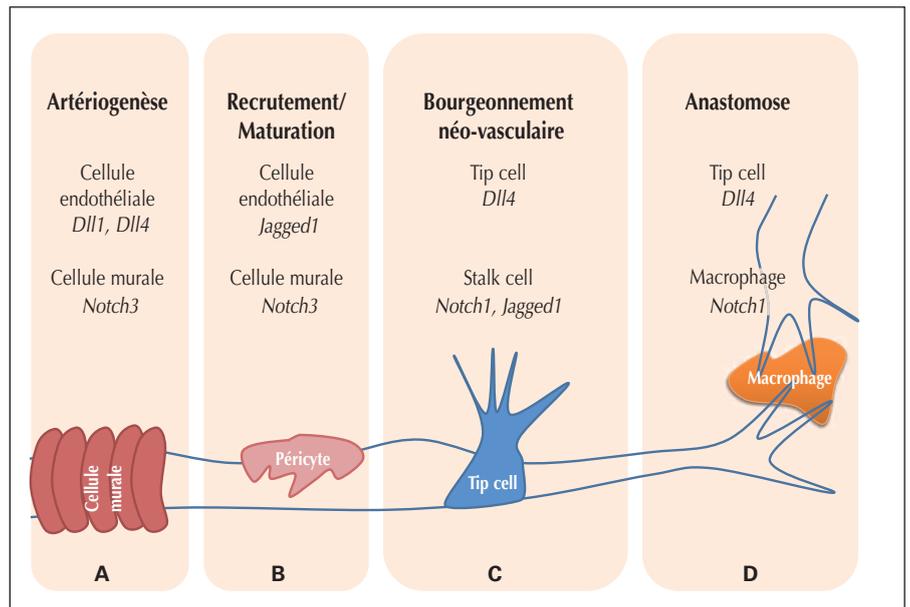


Figure 2. Rôle de la voie Notch dans l'angiogenèse et la maintenance de l'arbre vasculaire. Schéma des principales étapes de l'angiogenèse nécessitant l'intervention de la signalisation dépendante des récepteurs Notch.

Notch3 par le ligand Jag1 exprimé par les cellules endothéliales induit la différenciation des cellules murales en cellules de muscle lisse et augmente l'expression de Notch3 dans les cellules musculaires, constituant ainsi une boucle auto-régulatrice d'amplification de ce processus [11]. Ces données ont été confirmées par une analyse de l'angiogenèse postnatale dans la rétine de souris, qui montre que l'absence de Notch3 limite fortement le recouvrement vasculaire par les cellules de muscle lisse et les péricytes [5].

Rôle dans l'initiation du bourgeonnement lors de l'angiogenèse (figure 2C)

Durant le processus d'angiogenèse, il existe une spécialisation des cellules endothéliales qui conduit à deux états de différenciation distincts : les '*tip cells*' ont de fortes capacités migratoires et sont localisées à la pointe du bourgeon néovasculaire alors que les '*stalk cells*' prolifèrent à l'arrière des *tip cells* et assurent progressivement la formation du tube vasculaire. C'est la signalisation dépendante de Notch, et en particulier le ligand Dll4, qui est à la base de cette différenciation *tip cell versus stalk cell*. L'analyse de la vascularisation postnatale de la rétine de souriceaux pour lesquels la signalisation Dll4 est atténuée montre une forte induction du nombre de *tip cells* ainsi qu'une augmentation du branchement vasculaire [12, 13]. En fait, l'administration d'un inhibiteur des γ -sécréta-

ses, qui bloque l'activation de la voie Notch, induit également la multiplication du phénotype *tip cell* parmi les cellules endothéliales, ce qui indique clairement que l'activation de Notch en réponse à Dll4 réprime l'acquisition de ce phénotype et, de ce fait, le branchement et le bourgeonnement vasculaire.

De plus, il a été montré que l'expression de Dll4 est stimulée par le VEGF et que l'activation de Notch dans les cellules endothéliales diminue l'expression du récepteur du VEGF [14]. L'ensemble des données de la littérature a donc permis d'établir un modèle selon lequel la présence d'un gradient diffusible de VEGF induit l'expression de Dll4 dans la cellule endothéliale la plus proche percevant la première ce signal. Le ligand Dll4 peut alors activer la voie de signalisation Notch dans les cellules avoisinantes, ce qui conduit à une baisse de l'expression du récepteur du VEGF et limite la réponse de ces cellules au stimulus angiogène (figure 2C). L'expression de Dll4 par les *tip cells* permet ainsi d'inhiber l'acquisition du phénotype *tip cell* par les autres cellules qui gardent leur phénotype de *stalk cells* et restreint ainsi la multiplication des bourgeonnements endothéliaux [13]. Ce processus peut être modulé par un autre ligand de la famille Notch. Lors de la vascularisation de la rétine de souris, l'inactivation de Jag1 dans les cellules endothéliales induit la formation d'un réseau vasculaire de plus faible densité contenant moins de *tip cells*. Jag1 pourrait donc agir comme un antagoniste de Dll4 sur l'activation de

Notch *via* une interaction en *cis* avec son récepteur Notch dans les *stalk cells*. Cette interaction a pour effet de maintenir les cellules endothéliales dans un état activé, capable de répondre aux stimuli angiogènes et ainsi de multiplier le nombre de *tip cells*. En outre, cette interaction en *cis* peut être modulée par la glycosylation du récepteur de Notch qui favorise l'interaction du récepteur avec le ligand Dll [15].

Rôle dans l'anastomose des bourgeons vasculaires (figure 2D)

Lors de l'anastomose de deux bourgeons vasculaires, il a été montré que les macrophages environnants pouvaient favoriser le rapprochement entre les deux vaisseaux naissants. L'inhibition de Notch1 dans les macrophages semble réduire l'anastomose, suggérant que l'interaction entre le récepteur Notch1 des macrophages et les ligands Dll4 exprimés par les *tip cells* faciliterait le raccordement et l'anastomose des vaisseaux [16].

Interférence avec les autres voies de signalisation

L'une des particularités de la voie de signalisation Notch/Delta-like est que la partie clivée intracellulaire du récepteur Notch (NICD) ne peut en aucun cas se lier seule avec l'ADN ; son activité transcriptionnelle nécessite donc son association avec un co-activateur/co-répresseur. Il a été montré que la surexpression de NICD peut induire son interaction avec de multiples cofacteurs transcriptionnels de différentes voies de signalisation telles que celles du TGF β , des BMPs, de NF κ B ou de HIF1 α et moduler l'expression de leurs gènes cibles [17, 18].

De plus, il existe une véritable connexion entre la signalisation Notch et plusieurs autres voies de signalisation qui régulent l'angiogenèse. Le VEGF ou l'hypoxie induisent l'expression de Dll4 qui en retour réprime l'expression du récepteur du VEGF, limitant ainsi la réponse des cellules endothéliales et le bourgeonnement vasculaire. BMP9, un facteur important de l'angiogenèse appartenant à la famille du TGF β , régule l'expression de Dll4 et de Jag1 et l'activation de son récepteur potentialise l'effet de la signalisation Notch [19, 20].

L'ensemble de ces résultats montre que la signalisation Notch participe à la coordination des différentes voies de signalisation nécessaires au processus d'angiogenèse.

Aspects thérapeutiques

Signalisation Notch et maladies génétiques

Plusieurs pathologies humaines caractérisées par des malformations vasculaires ou des défauts d'angiogenèse résultent du dysfonctionnement de la signalisation Notch. Dans le cas du CADASIL (*cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarction and leukoencephalopathy*), ce sont des mutations du récepteur Notch3 qui induisent des accidents vasculaires cérébraux et une démence vasculaire, alors que pour le syndrome d'Alagille, associant malformations hépatiques et cardiopathie congénitale, ce sont des mutations de Jag1 qui ont été identifiées [21, 22]. Il n'existe pas à ce jour de thérapies permettant de moduler la signalisation Notch pour le traitement de ces deux pathologies.

Signalisation Notch et angiogenèse tumorale

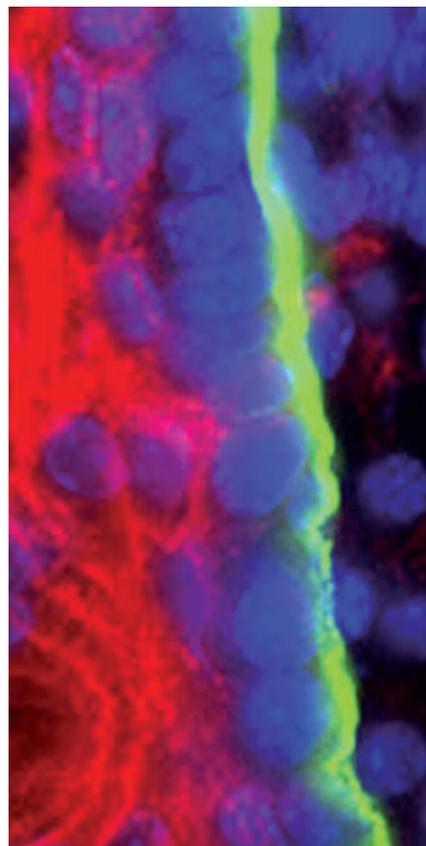
La signalisation dépendante de Notch est impliquée dans plusieurs étapes de l'angiogenèse et a donc été envisagée pour une thérapie anti-tumorale ciblée. Plusieurs inhibiteurs de l'activité des γ -sécrétases

(GSI), responsables du clivage du NICD suivant l'activation du récepteur Notch, ont été développés et induisent une diminution de la croissance tumorale. Cependant, leur utilisation peut engendrer de forts effets toxiques gastro-intestinaux, notamment à cause du rôle des γ -sécrétases dans des voies de signalisation autres que Notch [23]. Afin de cibler plus précisément la signalisation Notch, une forme soluble du récepteur Notch1 (Notch1 *decoy*) a été produite. Elle aboutit à un effet antagoniste sur l'activation de la voie ainsi qu'à un ralentissement de la croissance tumorale associée à une diminution de la néo-angiogenèse [24].

Il a également été montré que l'expression de certains facteurs de la voie Notch peut être fortement induite dans la vascularisation tumorale ; c'est notamment le cas pour Dll4 [25]. Le contrôle de l'expression de ce ligand à la fois par le VEGF et l'hypoxie, ainsi que son rôle critique dans l'initiation du bourgeonnement endothélial, le placent comme un acteur essentiel de l'angiogenèse tumorale. Un anticorps neutralisant et une forme soluble de Dll4 ont été développés. Leur administration induit une diminution de la croissance tumorale. De manière surprenante, l'inhibition de l'action de Dll4 augmente la néo-vascularisation tumorale ; cependant le réseau vasculaire est alors non fonctionnel et peu perfusé, ce qui explique l'inhibition de la croissance tumorale observée [26, 27]. Si ce traitement ne semble pas avoir les mêmes effets toxiques que les GSI, l'administration chronique d'un inhibiteur de l'activité de Dll4 peut causer une activation pathologique des cellules endothéliales et l'apparition de néoplasies vasculaires [28]. Malgré ces limitations, plusieurs essais cliniques de phase II incluant l'inhibition de l'activation de la signalisation Notch sont en cours et représentent une voie thérapeutique intéressante pour inhiber l'angiogenèse tumorale.

Conclusion

Les données récentes de la littérature placent clairement la signalisation Notch comme un coordinateur essentiel de la formation et de la maintenance du réseau vasculaire. Les différentes interactions récepteurs/ligands de cette voie régulent le devenir des cellules endothéliales *via* l'acquisition de phénotypes particuliers ou le recrutement de cellules partenaires (cellules murales, macrophages) nécessaires à l'aboutissement du processus d'angiogenèse. Les cellules endothéliales utilisent en fait cette signalisation comme un véritable moyen de communi-



cation à courte distance qui permet l'intégration des signaux provenant des cellules les plus proches à la manière d'un réseau wifi.

Liens d'intérêts : aucun.

Références

1. D'Souza B, et al. *Oncogene* 2008 ; 27 : 5148-67.
2. Kopan R, et al. *Cell* 2009 ; 137 : 216-33.
3. Limbourg A, et al. *Circ Res* 2007 ; 100 : 363-71.
4. Krebs T, et al. *Genes Dev* 2000 ; 14 : 1343-52.
5. Liu H, et al. *Circ Res* 2010 ; 107 : 860-70.
6. Duarte A, et al. *Genes Dev* 2004 ; 18 : 2474-8.
7. Krebs LT, et al. *Genes Dev* 2004 ; 18 : 2469-73.
8. Sorensen I, et al. *Blood* 2009 ; 113 : 5680-8.
9. Domenga V, et al. *Genes Dev* 2004 ; 18 : 2730-5.
10. High FA, et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008 ; 105 : 1955-9.
11. Liu H, et al. *Circ Res* 2009 ; 104 : 466-75.
12. Hellstrom M, et al. *Nature* 2007 ; 445 : 776-80.
13. Suchting S, et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007 ; 104 : 3225-30.
14. Taylor KL, et al. *Microvasc Res* 2002 ; 64 : 372-83.
15. Benedito R, et al. *Cell* 2009 ; 137 : 1124-35.
16. Outtz HH, et al. *Blood* 2011 ; 118 : 3436-9.
17. Kluppel M, et al. *Bioessays* 2005 ; 27 : 115-8.
18. Poellinger L, et al. *Curr Opin Genet Dev* 2008 ; 18 : 449-54.
19. Larrivee B, et al. *Dev Cell* 2012 ; 22 : 489-500.
20. Ricard N, et al. *Blood* 2012 ; 119 : 6162-71.
21. Joutel A, et al. *Nature* 1996 ; 383 : 707-10.
22. Rehman AO, et al. *Trends Cell Biol* 2006 ; 16 : 293-300.
23. Oon CE, et al. *Biochem Soc Trans* 2011 ; 39 : 1612-8.
24. Funahashi Y, et al. *Cancer Res* 2008 ; 68 : 4727-35.
25. Patel NS, et al. *Cancer Res* 2005 ; 65 : 8690-7.
26. Noguera-Troise I, et al. *Nature* 2006 ; 444 : 1032-7.
27. Ridgway J, et al. *Nature* 2006 ; 444 : 1083-7.
28. Yan M, et al. *Nature* 2010 ; 463 : E6-7.