

Thèse de Doctorat

Sylvain PAGIE

*Mémoire présenté en vue de l'obtention du
grade de Docteur de l'Université de Nantes
sous le sceau de l'Université Bretagne Loire*

École doctorale : Biologie-Santé

Discipline : Aspects moléculaire et cellulaire de la biologie

Spécialité : Biologie des organismes

Unité de recherche : INSERM UMR 1064

Soutenue le 30.09.2016

Thèse N° :

Mécanismes effecteurs du rejet aigu humoral : Contribution de la voie Notch et du ligand Dll4 à l'interface endothélium/macrophages et à la polarisation des macrophages

JURY

Président :	Yves DELNESTE, Docteur, CHU Angers
Rapporteurs :	Evelyne LAURET, Docteur, Institut Cochin Jean-Paul DUONG VAN HUYEN, Professeur, Hôpital Necker
Directeur de Thèse :	Béatrice CHARREAU, Docteur, CHU Nantes
Co-directeur de Thèse :	Claire TOQUET, Docteur, CHU Nantes

Remerciements

Je tiens à remercier le Dr Evelyne Lauret et le Pr Jean-Paul Duong-Van-Huyen pour avoir accepté de rapporter ce travail de thèse, ainsi que le Dr Yves Delneste pour avoir pris le temps d'examiner mon manuscrit.

Je remercie également le Dr Ignacio Anegon pour m'avoir accueilli au sein de l'unité INSERM U1064 ainsi que le Dr Isabelle Corre et le Dr Vincent Sauzeau pour leur participation à mes comités de thèse.

Merci à toi Béatrice pour la confiance que tu m'as accordé au cours de ces 5 années. Merci pour ton accueil, tes conseils et ton aide. Tu as toujours été disponible et à l'écoute, tu as su me guider dans ces travaux. Je suis désolé pour tous les soucis que je t'ai causé, mon épaule, mon pouce et surtout mon contrat. J'ai beaucoup appris auprès de toi et ça a été une expérience que je n'oublierai pas.

Merci Claire pour toute l'aide que tu m'as apporté au cours de ce projet, pour ta gentillesse, ton expertise en anapath et ton investissement dans la correction de cette thèse. Merci pour le temps que tu as passé avec moi devant les lames.

Merci à toi Angélique pour ton encadrement, tes conseils et ta patience avec moi lorsque j'étais ton boulet ! Ce n'était pas gagné ! On a formé la Dream team qui a permis l'avancée de ces travaux et j'espère être amené à retravailler avec toi.

Merci Nathalie pour ton expertise en BioMol, pour ton investissement et ton aide dans les dernières manips de cette thèse.

Un gros merci à tous les LLosers du club des LLosers Sarah, Mélanie N, Mélanie C, VirG, Vanessa, Gaëlle ça a été 5 années formidables de blagues, de rire et de partage. Merci à tous les autres aussi pour nous avoir supporté B et moi pendant ces années PJ, Lyssia, Tieuma, JP, Maxime. Merci à notre ancienne collègue de bureau Gwen la bigoudaine et à tous les membres de l'unité.

Un merci spéciale et unique à mes Sylvettes, Sarah, Mélanie N, VirG et Mélanie C, merci de m'avoir fait croire que c'était moi le chef ! Vous êtes les meilleures et je vous souhaite tout le bonheur du monde professionnellement et familialement. Vous avez choisi le bon côté n'en doutez jamais

Merci à toi Alex, tu as été notre troisième larron et notre victime préférée. Merci d'avoir supporté tout ce qu'on t'a fait subir toute ces années.

Un énorme merci à mon B, mon Bryan. Ces 4 années ont été tellement énormes !!! Merci d'avoir participé à tous nos trips, tous ces fous rires et à tout ce qu'on a fait endurer aux autres (notamment Franck, notre héros, notre modèle). Avec qui d'autres aurais-je pu faire de l'origami, les défis basket, de la gondole dans les couloirs, et partager autant de chose. Merci pour toutes tes minutes du savoir inutile durant les pauses café. Tu as été un voisin de bureau formidable et surtout un ami indispensable. Je te souhaite plein de bonheur et de réussite dans ton nouveau projet, je croise les doigts pour toi. Encore merci pour tout.

Merci à toute ma famille, mes parents, pour tout ce que vous m'avez apporté, ces études ont été possible grâce à vous et à votre confiance. Vous avez toujours cru en moi et j'espère vous rendre fier. Je grave dans ce papier ce qu'un garçon a parfois du mal à dire. Je vous aime.

Merci à mes Bro, vous aussi vous avez toujours cru en votre petit frère, vous avez toujours pris soin de moi et vous avez toujours été là à surveiller le petit. Je suis fier de partager ça avec vous, vous êtes les meilleurs frères dont on puisse rêver.

Merci à ma belle-famille Alain, Brigitte et Gomart. Depuis le début vous m'avez accueilli à bras ouverts. Je vous remercie pour tous ces moments de vie passés avec vous, et je vous remercie de croire en moi. Vous êtes une famille formidable et je suis heureux d'en faire partie.

Enfin comment pourrais-je ne pas te remercier. Tu m'as toujours encouragé, tu as toujours été là, dans les moments de joie comme dans les moments de doutes, et il y en a beaucoup au cours d'une thèse. Tu as su me mettre le pied au **l quand j'en avais besoin. Tu me pousse à être meilleur. J'ai toujours voulu te rendre fière de moi. Notre rencontre était improbable, et aujourd'hui tu as accepté de partager le reste de ta vie avec moi. Chaque jour passé avec toi est un cadeau et aucun mot ne peut décrire ce que tu représentes pour moi, tu es tout, tu es mon âme sœur, tu es mon Ohana. Je t'aime.

INVICTUS

Dans les ténèbres qui m'enserrent
Noires comme un puits où l'on se noie
Je rends grâce aux dieux, quels qu'ils soient
Pour mon âme invincible et fière.
Dans de cruelles circonstances
Je n'ai ni gémi ni pleuré
Meurtri par cette existence
Je suis debout, bien que blessé.
En ce lieu de colère et de pleurs
Se profile l'ombre de la Mort
Je ne sais ce que me réserve le sort
Mais je suis, et je resterai sans peur.
Aussi étroit soit le chemin
Nombreux, les châtements infâmes
Je suis le maître de mon destin
Je suis le capitaine de mon âme.

William Ernest Henley (1843-1903)

Sommaire

TABLE DES FIGURES	3
ABBREVIATIONS.....	6
INTRODUCTION	8
PARTIE I: Le rejet aigu humoral (RAH/AMR)	11
I- Caractérisation immunohistopathologique de l'AMR	13
1- Conséquences cliniques du rejet aigu humoral.....	15
II- Mécanismes physiopathologiques du rejet aigu humoral	16
1- Les cellules endothéliales : cellules cibles et effecteur de l'AMR	16
III- Les effecteurs humoraux de l'AMR	24
1- Les anticorps anti-HLA et non-HLA : origine et impact dans l'AMR	24
2- Le complément : activation de la voie classique et synthèse du C4d	30
PARTIE II : Les macrophages : Différenciation, polarisation, fonction.	32
I- Les macrophages.....	33
1- Les macrophages M1/M2	34
II- L'interaction monocyte/macrophage et endothélium	39
III- Monocyte/macrophage et apoptose	40
1- Les mécanismes de l'apoptose.....	40
PARTIE III : La voie de signalisation Notch	44
I- Définition et fonctions de la voie de signalisation Notch.....	45
1- Structure et mécanismes d'activations de la voie Notch	46
2-Mécanismes de contrôles de la voie de signalisation Notch	51
3- Le Delta like ligand 4	52
II- La voie Notch en transplantation.....	57

Contexte et Objectifs du Projet de thèse	58
I- Contexte de l'étude : Notch et endothelium en Transplantation	58
II- Objectifs du Projet de recherche	60
RESULTATS.....	63
PARTIE I : Contribution de l'expression du ligand Notch Dll4 et de l'IL-6 par la cellule endothéliale au cours du rejet aigu humoral	64
PARTIE II : Dll4 : Un ligand contrôlant la polarisation en macrophage M2 et l'apoptose.....	81
PARTIE III : Rejet humoral aigu en l'absence d'anticorps anti-HLA spécifiques du donneur : Recherche de nouvelles cibles antigéniques	110
PARTIE IV : Caractérisation de nouvelles molécules d'origine naturelle anti-inflammatoires et/ou immunosuppressives bioactives sur l'endothélium : étude des dérivés de coumarines.	125
DISCUSSION & CONCLUSION	155
Bibliographie.....	170
ANNEXES.....	189
Production scientifique.....	191

TABLE DES FIGURES

Figure 1: Chiffres de la répartition des organes greffés en France en 2014	9
Figure 2: Chiffres de l'évolution du nombre de greffes réalisées en France de 2005 à 2014, en comparaison au nombre de patients inscrits sur liste d'attente sur la même période.....	10
Figure 3 : Caractérisation immunohistologique du rejet humoral..	13
Figure 4 : Représentation du suivi de la survie post transplantation des patients ayant reçu une allogreffe cardiaque jusqu'à leur décès..	15
Figure 5 : Mécanismes intracellulaires de l'activation endothéliale de type 1.	19
Figure 6 : Mécanismes intracellulaires de l'activation endothéliale de type II.	21
Figure 7 : Interaction de la cellule endothéliale avec les autres médiateurs du rejet humoral.....	23
Figure 8 : Représentation des étapes du développement de l'AMR rénale en fonction du temps post greffe et des différentes phases de la pathologie, normale, sub-clinique et clinique.....	27
Figure 9 : Impact de la présence de DSA post-transplantation dans la pathogénèse du rejet aigu humoral.....	28
Figure 10 : Cascade d'activation du complément conduisant au dépôt de C4d à la surface de la cellule endothéliale.....	31
Figure 11 : Hétérogénéité de la population macrophagique et dénomination selon le tissu de résidence.....	33
Figure 12 : Polarisation <i>in vitro</i> et classification des macrophages pro-inflammatoires (M1) et anti-inflammatoires (M2)	35
Figure 13 : Mécanismes transcriptionnels de la polarisation des macrophages M1 et M2.....	36
Figure 14 : Mécanismes intracellulaires de la régulation de la longévité des cellules monocytes/macrophages.....	41
Figure 15: Impact de l'expression du gène <i>Notch</i> chez la Drosophile..	45
Figure 16 : Structure générale des récepteurs Notch et des ligands JAG et DII (d'après Andersson et Lendahl, 2014).	46
Figure 17 : Mécanismes de maturation et d'activation de la voie de signalisation Notch.	49

Figure 18 : Impact de l'expression de Dll4 sur l'angiogenèse : formations de structures vasculaires non fonctionnelles.	53
Figure 19 : Implication de la voie de signalisation Notch au cours des étapes précoces de la lymphopoïèse T.	54
Figure 20. Objectifs et étapes du projet de recherche.	62
Figure 21 : Exemple de rejet aigu humoral en l'absence d'anticorps anti-HLA spécifiques du donneur	112
Figure 22. Phénotype des cellules CiGenc avant et après une stimulation de 48h avec du TNF- α et de l'IFN- γ	115
Figure 23 : Représentation schématique de l'approche méthodologique utilisée pour la mise en évidence d'anticorps réactifs vis à vis des cellules vasculaires.	116
Figure 24 : Analyse de la réactivité des sérums du jour du rejet (dilution 1/4) pour les CE macrovasculaires.	118
Figure 25 : Analyse de la réactivité des sérums prélevés le jour du rejet (dilution 1/4) pour les CE microvasculaires CiGenc.	119
Figure 26 : Réactivité des sérums de 5 donneurs volontaires sains (HV) sur les cellules CiGenc.	119
Figure 27. Synthèse de l'analyse des réactivités des sérums du jour du rejet sur les différents types cellulaires testés.	120
Figure 28: Réactivités des sérums contrôles (CTL SAB) ou de patients présentant un rejet aigu humoral (WIC, 032, KAM) utilisant des dilutions limites des sérums incubés avec les cellules CiGenc.	121
Figure 29 : Réactivités des sérums contrôles (CTL SAB) ou du patient avec RAH (KAM) prélevés le jour de la greffe (J0) et au moment du rejet (Rej) utilisant des dilutions limites des sérums incubés avec les cellules CIGENC.....	121
Figure 30 : Comparaison de la réactivité des sérums pour des cellules rénales CiGenc différenciées ou non.	122
Figure 31 : Réactivité des sérums de patients non-greffés atteints d'une pathologie rénale	123
Figure 32 : Synthèse des résultats obtenus.....	124
Figure 33 : Composés sélectionnés pour l'étude des effets sur un panel de marqueurs endothéliaux de l'inflammation et de l'immunité	128

Figure 34 : Interactions intracellulaires de la voie de signalisation Notch.....	161
Figure 35 : Voies de signalisations activées par l'IL-4..	163
Figure 36. Contrôle transcriptionnel de l'identité et de la polarisation des macrophages.....	164

ABBREVIATIONS

ACR: Acute Cellular Rejection

AECA: Anti-Endothelial Cells Antibody

AMR: Antibody Mediated Rejection

AP-1: Activator Protein 1

BCR: B-Cell Receptor

CAV: Cardiac Allograft Vasculopathy

CCL: Chemokine (C-C motif) Ligand

CDC: Complement Dependent Cytotoxicity

CE: Cellule Endothéliale

CMH: Complexe Majeur d'Histocompatibilité

COX: Cyclo Oxygénase

DII: Delta-like ligand

DSA: Donor Specific Antibody

EMB: EndoMyocardial Biopsies

GDP: Guanosine DiPhosphate

GMCSF: Granulocyte Macrophages Colony Stimulating Factor

GPCR: G Protein Coupled Receptor

GVHD: Graft Versus Host Disease

HLA: Human Leukocyte Antigen

ICAM-1: InterCellular Adhesion Molecule-1

Ig: Imunnoglobuline

IL: InterLeukine

IP3: Inositol triphosphate

IRF: Interferon Regulator Factor

ISHLT: International Society for heart and Lung Transplantation

KLF4: Kruppel-Like Factor 4

LB: Lymphocyte B

LPS: LipoPolySaccharide

LT: Lymphocyte T

MAC: Membrane Attack Complex

MCP-1: Monocyte Chemotactic Protein-1

MCSF: Macrophage Colony-Stimulating Factor

MLC: Myosine Light Chain

MLCK: MLC Kinase

MyD88: Myeloid Differentiation primary-response protein 88

NECD: Notch Extra Cellular Domain

NF-κB: Nuclear Factor Kappa B

NICD: Notch Intracellular Domain

NO: Nitric Oxide

NOS3: Nitric Oxide Synthase

PGI2: ProstaGlandin I2

PIP2: Phosphatidylinositol diphosphate

PKC: Protein Kinase C

PLCβ: Phospholipase C β

PPAR: Peroxisome Proliferator Activated Receptor

SOCS: Suppressor Of Cytokines Signaling

STAT: Signal Transducer and Activator of Transcription

TAM: Tumor Associated Macrophage

TCR: T-Cell Receptor

TGF: Transforming Growth Factor

TIRAP: Toll-Interleukin 1 Receptor (TIR) Domain Containing Adaptor Protein

TLR: Toll-Like Receptor

TNF: Tumor Necrosis factor

TNFR: TNF Receptor

TRADD: TNFR1 Associated Death Domain

TRAF2: TNFR Associated Factor 2

VCAM-1: Vascular Cell Adhesion Molecule-1

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

vWf: von Willebrand factor

WPB: Weibel-Palade Body

INTRODUCTION

Enjeux et défis de la Transplantation

La transplantation constitue un acte chirurgical de remplacement d'un organe vascularisé suite à une perte de fonction. Il existe trois dénominations pour caractériser une transplantation : syngénique, entre deux individus parfaitement identiques génétiquement (vrais jumeaux), xénogénique lorsque le donneur et le receveur sont d'espèces différentes et enfin, allogénique, lorsque le donneur et le receveur sont génétiquement différents mais appartiennent à la même espèce.

Les progrès scientifiques et médicaux permettent aujourd'hui la transplantation de 6 organes vascularisés différents, comprenant le cœur, le foie, les poumons, le pancréas, l'intestin et le rein, qui représente, en France, 60% de l'activité de transplantation d'organes (Figure 1).

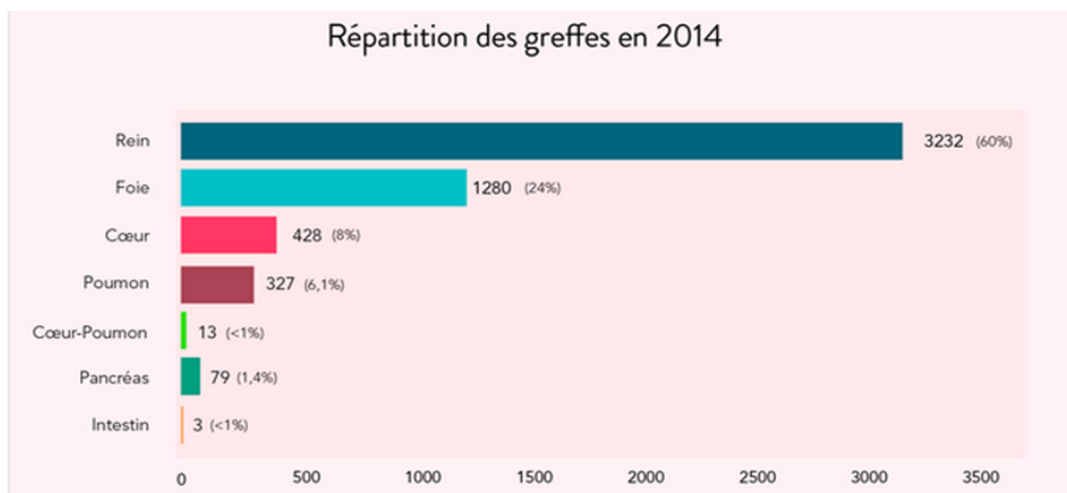


Figure 1: Chiffres de la répartition des organes greffés en France en 2014 (chiffres de l'Agence de la Biomédecine 2015). 5362 greffes ont été réalisées en 2014 réparties en 6 catégories, rein, foie, cœur, cœur-poumons, pancréas et intestin.

Toutefois, l'accroissement de la longévité, l'amélioration des techniques de transplantation de même que les résultats en termes de durée et de qualité de vie du patient, ont conduit à une augmentation du nombre de recommandation à la transplantation entraînant également une pénurie d'organes.

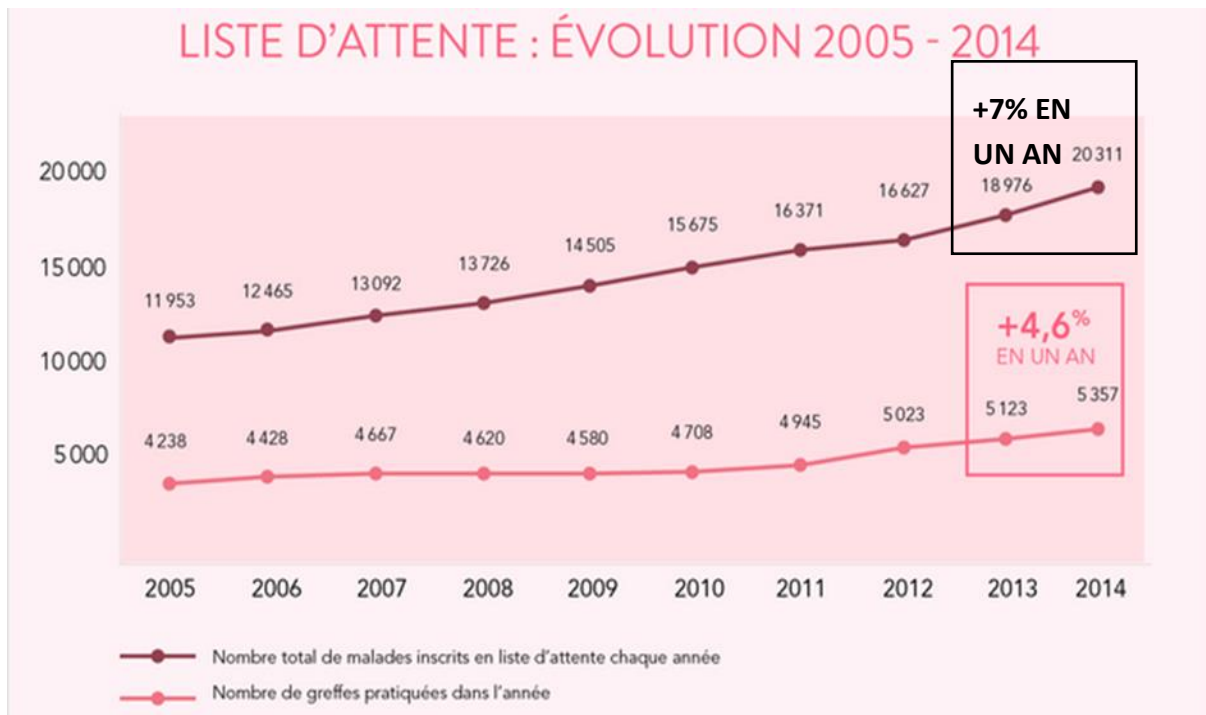


Figure 2: Chiffres de l'évolution du nombre de greffes réalisées en France de 2005 à 2014, en comparaison au nombre de patients inscrits sur liste d'attente sur la même période (Chiffres ABM 2015 pour l'année 2014).

En effet, comme nous pouvons le voir en Figure 2, entre 2014 et 2015, le nombre de greffes réalisées (toutes greffes confondues) a augmenté de 4,6% en un an alors que le nombre de personnes inscrites sur liste d'attente a augmenté de 7% sur la même période. Il y a donc en un an 2,4% de patients, soit presque 500 personnes qui ne recevront pas de greffes et qui devront alors soit faire appel à une thérapie alternative, soit poursuivre leur attente d'une transplantation. Ces 500 patients viendront alourdir la liste d'attente. Entre 2005 et 2014 le nombre de demandeur sur liste d'attente a augmenté de 70% alors que le nombre de transplantation sur la même période n'a quant à lui augmenté que de seulement 26,5%. La pénurie d'organe constitue donc un problème de santé publique majeur.

De plus, lorsque le patient parvient à obtenir une transplantation, le succès de cette dernière reste limitée par la survenue du rejet du greffon, qui limite la durée de vie de l'organe transplanté et du patient. Par conséquent, améliorer la survie de greffe par une meilleure connaissance des mécanismes immunologiques du rejet constitue un enjeu majeur en transplantation humaine.

PARTIE I:

Le rejet aigu humoral (RAH/AMR)

Le rejet aigu humoral (RAH) ou rejet médié par les anticorps (AMR) de l'allogreffe cardiaque, a été décrit pour la première fois en 1987 par Herskowitz (Herskowitz *et al.*, 1987), 20 ans après la première transplantation cardiaque réalisé par le Pr Christian Barnard en Afrique du Sud. Il identifia un groupe de patients transplantés cardiaques présentant une vascularite des artérioles associé à un mauvais pronostic de survie. Puis, Hammond démontrera que ce rejet, ayant pour cause une atteinte vasculaire, est associé à un dépôt d'anticorps et une activation du système du complément (Hammond *et al.*, 1989). Dans les années 90, la transplantation connaît une révolution majeure par l'arrivée des premiers immunosuppresseurs. Ces derniers permirent d'améliorer la survie du greffon en réduisant de façon très significative la survenue du rejet aigu cellulaire. Cependant, ces stratégies thérapeutiques n'ont montré que peu, voir aucune influence sur l'incidence de l'AMR (Wu *et al.*, 2009). L'identification et la caractérisation de ce rejet continuera, et en 25 ans, l'AMR de l'allogreffe cardiaque passera d'un concept très mal défini à une complication clinique post-transplantation reconnue chez les patients transplantés (Berry *et al.*, 2013 ; Haas *et al.*, 2014). Bien que longtemps sous-estimé, les chiffres montrent que l'AMR survient chez 10 à 20% des patients dans les mois qui suivent la greffe et demeure la cause principale de la perte tardive du greffon (Michaels *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2009 ; Chih *et al.*, 2012).

Pathogénèse du rejet aigu humoral

De façon succincte, classiquement, l'AMR est induit par la fixation d'anticorps à la surface de l'endothélium, cette fixation entraîne d'une part l'activation de la cellule endothéliale et d'autre part le recrutement de la molécule du complément C1q. Le recrutement du C1q par le complexe antigène/anticorps entraîne son autolyse et l'activation de la voie classique du complément. La voie classique du complément conduit à la formation, à la surface de l'endothélium, du complexe d'attaque membranaire (MAC) pouvant entraîner la mort osmotique de la CE. Elle peut également entraîner le dépôt de C4d, biomarqueur de l'AMR, et la libération dans le sang de fragments solubles du complément, C5a et C3a, permettant de recruter par chimiotactisme les cellules macrophagiques. Toutes ces étapes conduisent à une inflammation micro et/ou macrovasculaire avec un risque de vasculopathie d'allogreffe et d'ischémie conduisant à la dysfonction de l'organe et au rejet.

I- Caractérisation immunohistopathologique de l'AMR

Les critères de la caractérisation histologique et de la classification de l'AMR sont définis régulièrement lors du congrès de Banff et/ou lors de l'ISHLT (International Society for Heart Lung Transplantation) pour l'AMR cardiaque (Berry *et al.*, 2013 ; Haas *et al.*, 2014). Ces congrès ont pour but d'aboutir à un consensus sur la définition immunohistopathologique du rejet humoral.

Ainsi, dans le contexte de la transplantation cardiaque, les biopsies endomyocardiques (EMB) de dépistage du rejet, seul outil diagnostique fiable à ce jour, sont notées et classées en fonction de critères histologiques et immunohistochimiques. Sur le plan histologique, les lésions se caractérisent par une inflammation microvasculaire associant une turgescence des cellules endothéliales et la présence de macrophages au sein des lumières vasculaires. Sur le plan immunohistochimique, les deux principaux critères sont la positivité de l'EMB pour la molécule du complément C4d, produit de clivage de la cascade du complément (voir partie II-2), qui se lie de façon covalente à la surface de l'endothélium et la positivité du marquage CD68, marqueur des cellules macrophagiques (Berry *et al.*, 2013) (Figure 3).

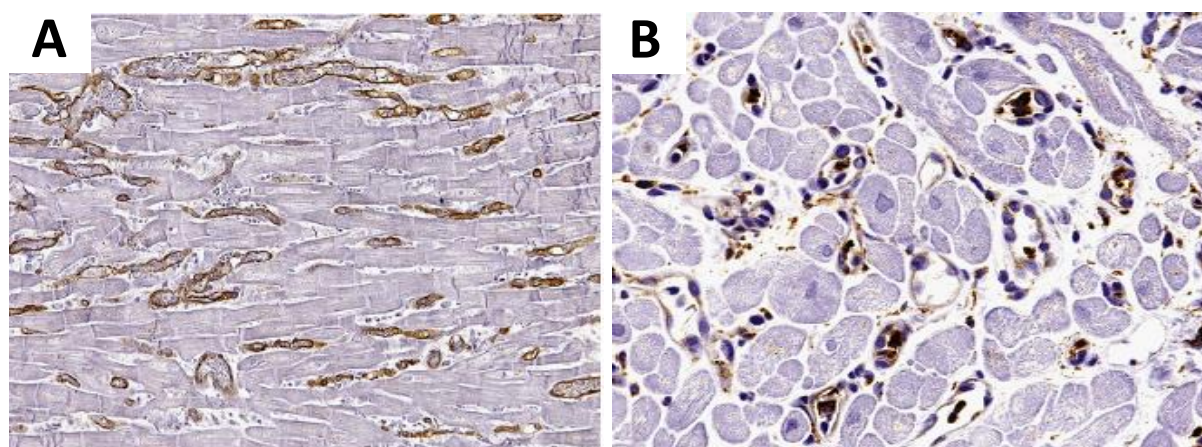


Figure 3 : Caractérisation immunohistologique du rejet humoral. (A) marquage des capillaires interstitiels pour le fragment C4d du complément. (B) marquage CD68 identifiant la présence de macrophages dans la lumière vasculaire des capillaires (d'après Berry *et al.*, 2013).

Le rejet humoral est donc caractérisé, anatomopathologiquement, par un marquage linéaire circonférentiel et diffus de plus de 50% des capillaires pour le C4d et/ou un immunomarquage intravasculaire des macrophages dans plus de 10% des capillaires.

Il est intéressant de noter que bien que médié par les anticorps, dont le rôle au cours de l'AMR est central, le diagnostic histologique du rejet aigu humoral ne prend pas en compte la présence d'immunoglobulines (Ig) dans les biopsies.

De cette façon, l'AMR pathologique (pAMR) est classé en 5 grades selon la sévérité des critères histologiques ou immunopathologiques (Berry *et al.*, 2013):

- pAMR0: Absence de rejet, EMB négative pour l'AMR à la fois au niveau histologique et immunopathologique.
- pAMR1(H+): Suspicion de rejet avec positivité des critères histologiques sans positivité des critères immunopathologiques.
- pAMR1(I+): Suspicion de rejet avec positivité des critères immunopathologiques sans traces d'atteintes au niveau histologique.
- pAMR2: Rejet avéré avec une positivité des critères histologiques et immunopathologiques de l'AMR.
- pAMR3: Rejet sévère avec une positivité des critères histologiques et immunopathologiques de l'AMR pouvant être associés à des hémorragies interstitielles, une fragmentation des capillaires, la présence d'œdèmes et un infiltrat inflammatoire mixte.

D'autres critères annexes peuvent être utilisés afin de compléter ou confirmer le diagnostic mais n'entrent pas dans la caractérisation de l'AMR. Pour exemple, un marquage de la molécule du complément C3d, un marquage de l'intégrité vasculaire *via* le CD31, ainsi qu'un marquage CD3 (pan-LT) ou CD20 (pan LB) afin de mieux discriminer et localiser les cellules mononuclées dans la lumière vasculaire (Revelo *et al.*, 2012)

Ainsi, le diagnostic du rejet humoral peut être rendu par un anatomopathologiste, sans la nécessité d'une dysfonction clinique ou de la détection de DSA (Kobashigawa *et al.*, 2011).

1- Conséquences cliniques du rejet aigu humoral.

Très récemment, Hammond *et al.*, ont réalisé une méta-analyse de plus de 30 000 biopsies d'allogreffes cardiaques, recueillies durant la période 1985-2012. Ces biopsies ont été classées selon les critères fixés durant l'ISHLT 2013 afin d'établir les courbes de survies associées aux différents grades pathologiques de l'AMR.

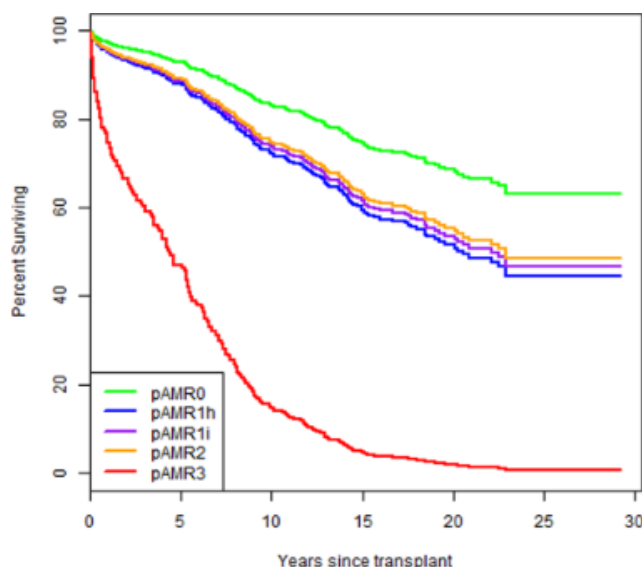


Figure 4 : Représentation du suivi de la survie post transplantation des patients ayant reçu une allogreffe cardiaque jusqu'à leur décès. La cause du décès est classée en tant que décès cardiovasculaire si elle résulte d'une mort soudaine suite au développement d'une pathologie cardiovasculaire (Infarctus, dysfonction progressive de l'allogreffe, arrêt cardiaque). Les différentes courbes représentent la survie des patients en fonction du grade pathologique de l'AMR, pAMR0, pAMR(H+), pAMR(I+), pAMR2 et pAMR3 (D'après Hammond *et al.*, 2016).

Les différentes courbes de survie visibles en Figure 4, confirment l'impact péjoratif du rejet humoral, notamment de grade pAMR3, pour laquelle la survie des patients est de 50% à 5 ans post-greffe et est inférieure à 20% à 10 ans post-greffe. Les grades pAMR1 (H+ et I+) et pAMR2 montrent une tendance similaire entre eux. Bien que moins sévère que le grade pAMR3, avec une survie à 10 ans de 70%, la survie à long terme (>10 ans) des autres grades pAMR est un facteur défavorable en comparaison du statut pAMR0. De manière générale, le développement d'épisodes de rejet humoral (pAMR1-pAMR3) est associé à un risque plus élevé de décès cardiovasculaire, et représente donc un mauvais pronostic pour la survie à long terme du greffon et du patient (Hammond *et al.*, 2016).

Malgré une caractérisation de plus en plus précise, le diagnostic du rejet aigu humoral reste complexe car la détection de changements histologiques de la microvasculature dépend de plusieurs facteurs méthodologiques tels que la qualité de la préservation du tissu, la fixation, l'épaisseur de la section et la qualité du marquage (Berry *et al.*, 2013). D'autre part,

l'identification des critères histopathologiques permettant la classification de l'AMR peut être commune à d'autres pathologies. En effet, la présence d'un infiltrat de cellules mononuclées peut également être un critère du rejet aigu cellulaire ou plus rarement d'un autre processus (effet quilty, infection, ischémie...).

Compte tenu de l'impact négatif de l'AMR sur la survie des greffons, l'identification de nouveaux marqueurs caractéristiques du rejet humoral est un défi actuel important pour atteindre un diagnostic clair, rapide et fiable permettant un dépistage précoce et une meilleure prise en charge du patient.

II- Mécanismes physiopathologiques du rejet aigu humoral

1- Les cellules endothéliales : cellules cibles et effecteur de l'AMR

Les cellules endothéliales, par la position qu'elles occupent, sont des cellules cruciales de l'organisme. En effet les CE s'associent pour former une monocouche cellulaire, l'endothélium, qui constitue la couche la plus interne du système circulatoire sanguin. De ce fait, il représente une surface d'échange importante entre le sang et les tissus et régule de nombreux mécanismes essentiels tels que l'angiogenèse, la production de cytokines, la perméabilité et le contrôle du tonus vasculaire, la synthèse et la dégradation de la matrice extracellulaire, l'adhésion et l'extravasation des leucocytes. L'endothélium contrôle également la fluidité du sang par le maintien d'une balance de mécanismes pro- et anticoagulants (pour revue Pober et Sessa, 2007). Un exemple concret des échanges entre la CE et l'environnement cellulaire adjacent est le contrôle du tonus vasculaire. En effet, le contrôle de la tonicité vasculaire permet la régulation du flux sanguin, et ne peut se faire sans l'aide des cellules musculaires lisses du vaisseau (SMC, Smooth Muscles Cells).

Ainsi, le tonus vasculaire est régulé par une balance de facteurs vasoconstricteurs ou vasodilatateurs produits par la cellule endothéliale, qui agissent sur la contractilité des SMC vasculaires adjacentes. Le facteur majeur du contrôle de la tonicité vasculaire produit par la CE est le monoxyde d'azote (NO), médiateur vasodilatateur majeur (Sessa, 2004).

Plus que de participer de manière primordiale aux mécanismes physiologiques de l'organisme, la CE possède également la capacité de présenter à sa surface des molécules du HLA de classe I mais également de classe II (Pober et Sessa, 2007). Cette capacité originale

pour une cellule non-immunitaire lui confère donc les caractéristiques d'une cellule présentatrice d'antigène dite non-professionnelle. De cette manière, la CE est susceptible de participer à des mécanismes immunitaires *via* l'interaction avec des LT à la fois CD4 et CD8. La cellule endothéliale joue donc également le rôle de sentinelle immunitaire de l'organisme. Cependant, la CE au repos n'interagit pas avec les leucocytes (Ley et Reutershan, 2006). En effet la cellule endothéliale, non activée par un stimulus pro-inflammatoire, va séquestrer au sein de vésicules intracellulaires des protéines essentielles de l'interaction avec les leucocytes et notamment la protéine P-sélectine ainsi que d'autres chimiokines.

Les vésicules endothéliales dans lesquelles sont retenues ces protéines portent le nom de corps de Weibel-Palade (WPBs, Weibel-Palade bodies) (Bonfanti *et al.*, 1989 ; Middleton *et al.*, 1997). A l'état de repos, la cellule endothéliale contrôle également au niveau transcriptionnel l'expression de molécules régulées lors de l'inflammation telles que E-selectine, les molécules d'adhésion des cellules à l'endothélium, VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion molecule 1) ou encore ICAM-1 (Intercellular adhesion molecule 1). Dans cet état de quiescence de la cellule, le NO participe à l'inhibition de l'expression de gènes pro-inflammatoire (De Caterina *et al.*, 1995), de la fusion des WPBs à la membrane de la CE, et, dans le sang, à l'inhibition de l'activation des leucocytes (Matsushita *et al.*, 2003).

Un défaut dans le maintien, par la cellule endothéliale, de l'équilibre de ces mécanismes est considéré comme une dysfonction endothéliale.

1-a La cellule endothéliale lors de l'inflammation

La cellule endothéliale, soumise à un stress ou un stimulus pro-inflammatoire (cytokines, fixation d'anticorps...) va acquérir de nouvelles capacités en comparaison de son état de repos, on parle alors d'activation endothéliale. Ce mécanisme d'activation peut être divisé en deux types de réponses : les réponses rapides et indépendantes de l'expression de nouveaux gènes ou activations de type I et les réponses plus tardives et plus lentes qui, dépendent de l'expression de nouveaux gènes et constituent les activations de type II (Pober et Cotran, 1990). Dans ces deux cas d'activations, rapides ou lentes, il existe 3 composants principaux mettant en évidence les signes d'une inflammation. Le premier est une augmentation du flux sanguin entraînant les phénomènes de rougeur et de chaleur du tissu

inflammé. Le second est la formation d'un liquide riche en protéines plasmatiques qui va pénétrer le tissu ainsi que le recrutement des leucocytes circulants, entraînant le gonflement de la plaie ou du tissu. Enfin, la libération par les leucocytes recrutés, de médiateurs, sur les fibres nerveuses sensibles, est à l'origine du 4^{ème} symptôme de l'inflammation, la douleur (Poher et Sessa, 2007).

1-a-i L'activation endothéliale de type I

L'activation endothéliale de type I (Figure 5) consiste en la reconnaissance d'un ligand par le domaine extracellulaire d'un récepteur couplé aux protéines G (GPCRs, G-protein-coupled receptor) (Poher et Cotran, 1990). La signalisation induite par cette liaison ligand/récepteur entraîne un échange GDP/GTP sur la sous unité α_q de la protéine G, qui est une protéine hétérotrimérique (α_q , β et γ). Cet échange GDP/GTP permet la dissociation de la sous unité α_q des deux autres dimères β et γ , et l'activation de l'isoforme β de la phospholipase C (PLC β). A son tour, la PLC β , *via* sa capacité enzymatique, va permettre la catalyse du lipide membranaire Phosphatidylinositol-(4,5)-di-phosphate (PIP₂) et la libération d'Inositol tri phosphate (IP₃). L'augmentation de la concentration en IP₃ va alors entraîner la libération d'ion Ca²⁺ par le réticulum endoplasmique (Birch *et al.*, 1994). L'augmentation de la concentration calcique cytosolique active la phospholipase A (PLA) dont la fonction est de dégrader la phosphatidylcholine de la membrane cellulaire en acide arachidonique et lysophosphatidylcholine.

L'étape suivante de cette cascade de signalisation est la conversion, par la cyclooxygénase-1 (COX1) et la prostacycline synthase, de l'acide arachidonique nouvellement formé en prostaglandine I₂ (PGI₂, ou prostacycline) (Mitchell *et al.*, 1995). La PGI₂ est connue pour son rôle vasodilatateur et son action sur les cellules musculaires lisses adjacentes (Egan et FitzGerald, 2006).

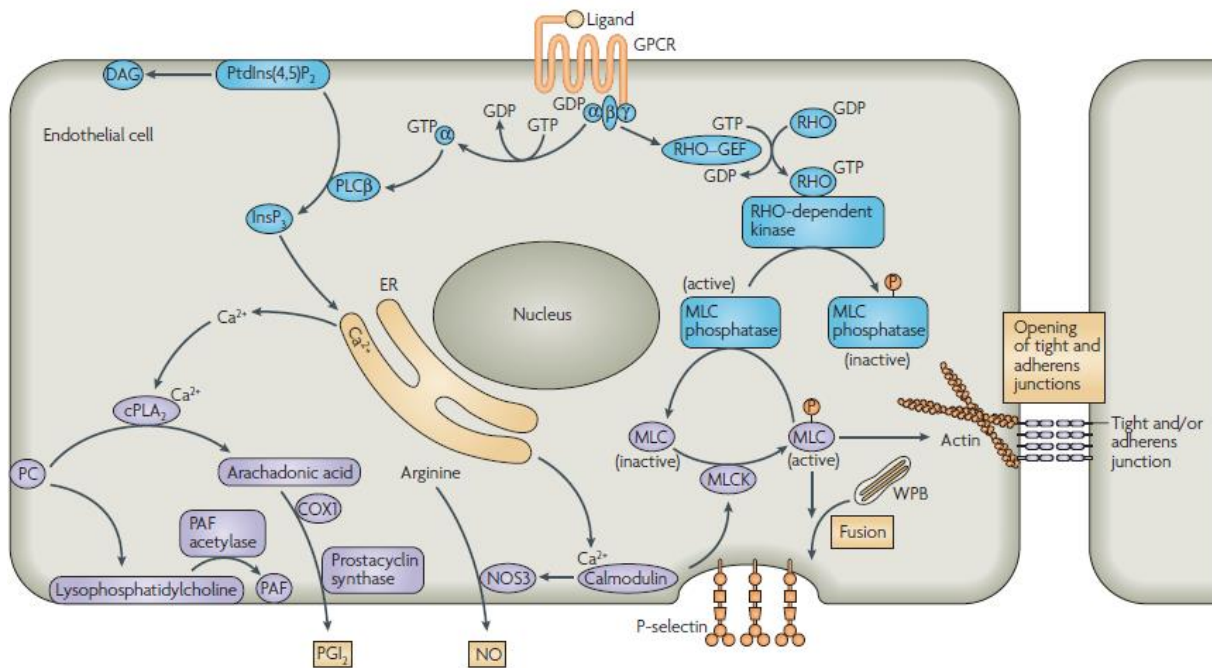


Figure 5 : Mécanismes intracellulaires de l'activation endothéliale de type 1 (d'après Pober et Sessa 2007).

Les ions Ca^{2+} cytosoliques vont également pouvoir activer la protéine calmoduline entraînant la formation d'un complexe Ca^{2+} /calmoduline capable d'activer l'enzyme responsable de la production de NO, la nitric-oxyde synthase 3 (NOS3). Ainsi, le NO synthétiser va également remplir sa fonction de vasodilatateur et agir sur la relaxation des cellules musculaires lisses adjacentes, en synergie avec le PGI_2 . De cette manière, la vasodilatation entraîne une augmentation du flux sanguin et, de fait, augmente la quantité de cellules leucocytaires disponible pour réguler l'inflammation du tissu. Parallèlement, le complexe Ca^{2+} /calmoduline peut également activer l'enzyme Myosin Light Chain Kinase (MLCK) dont le rôle est de phosphoryler les chaînes légères de myosine (Stevens *et al.*, 2000). En condition normale, cette réaction de phosphorylation est rapidement interrompue par l'intervention d'une phosphatase des chaînes légères de myosine, créant une balance de phosphorylation/déphosphorylation. Cependant, lors de l'activation d'un récepteur GPCR, la sous unité $\beta\gamma$ de la protéine G hétérotrimérique devient effecteur suite à la libération de la sous unité α et va participer à une cascade de signalisation, dépendante des protéines RAS/RHO (Niu *et al.*, 2003) conduisant à l'inhibition de la phosphatase des MLC. Cette inhibition de la phosphatase entraîne donc un déséquilibre de la balance phosphorylation/déphosphorylation en faveur d'une phosphorylation des MLC permettant la contraction des fibres d'actines. Ces fibres d'actines sont physiquement liées aux

protéines formant les jonctions serrées et les complexes d'adhérences. La contraction des fibres d'actines permet donc une ouverture des jonctions serrées intercellulaires entraînant la fuite, du vaisseau vers le tissu, de protéines plasmatiques à l'origine du symptôme du gonflement lors de l'inflammation (De Caterina *et al.*, 1995). Dans le même temps, la phosphorylation des chaînes légères de myosines entraîne l'exocytose des vésicules endothéliales WPBs. Les WPBs vont alors fusionner à la membrane cellulaire et permettre la libération et l'expression membranaire de P-sélectine, qui va participer à l'arrêt, au roulement et à la diapédèse des leucocytes (Schenkel *et al.*, 2002).

1-a-ii L'activation endothéliale de type II

L'activation endothéliale de type II (Figure 6), est un mécanisme de réponse de la cellule endothéliale plus tardif et nécessitant la transcription de nouveaux gènes, au contraire de la réponse de type I. L'activation endothéliale de type I, médiée par les récepteurs couplés aux protéines G a une durée de réponse de 10 à 20 min (Gainetdinov *et al.*, 2004). Passé ce temps, les GPCR vont être désensibilisés dans le but d'éviter une réactivation de ces derniers et donc empêcher une activation soutenue et un déséquilibre de la signalisation dépendante de ces récepteurs (Gainetdinov *et al.*, 2004). Si l'inflammation persiste, une réponse plus appropriée de la CE est nécessaire et il y a donc la mise en place d'une activation de type II. Cependant, l'activation endothéliale de type II reste fortement dépendante de la mise en place préalable de l'activation endothéliale de type I. En effet, plusieurs mécanismes (i.e augmentation de la concentration cytosolique de Ca^{2+} , libération d'acide arachidonique) et activation d'effecteurs, induit par la première réponse sont nécessaires à la seconde (Zavoico *et al.*, 1989).

L'activation de type II se met en place lors de la liaison d'un médiateur de l'inflammation sur son récepteur. Les médiateurs principaux de cette activation sont le Tumor Necrosis Factor (TNF)- α et l'IL-1 qui vont alors être reconnus par leurs récepteurs de type I, le TNF Receptor 1 (TNFR1) et l'IL-1 receptor (IL-1R1). Cette reconnaissance entraîne la formation de complexes de signalisations dans le cytoplasme de la cellule, différents selon la nature de l'activation.

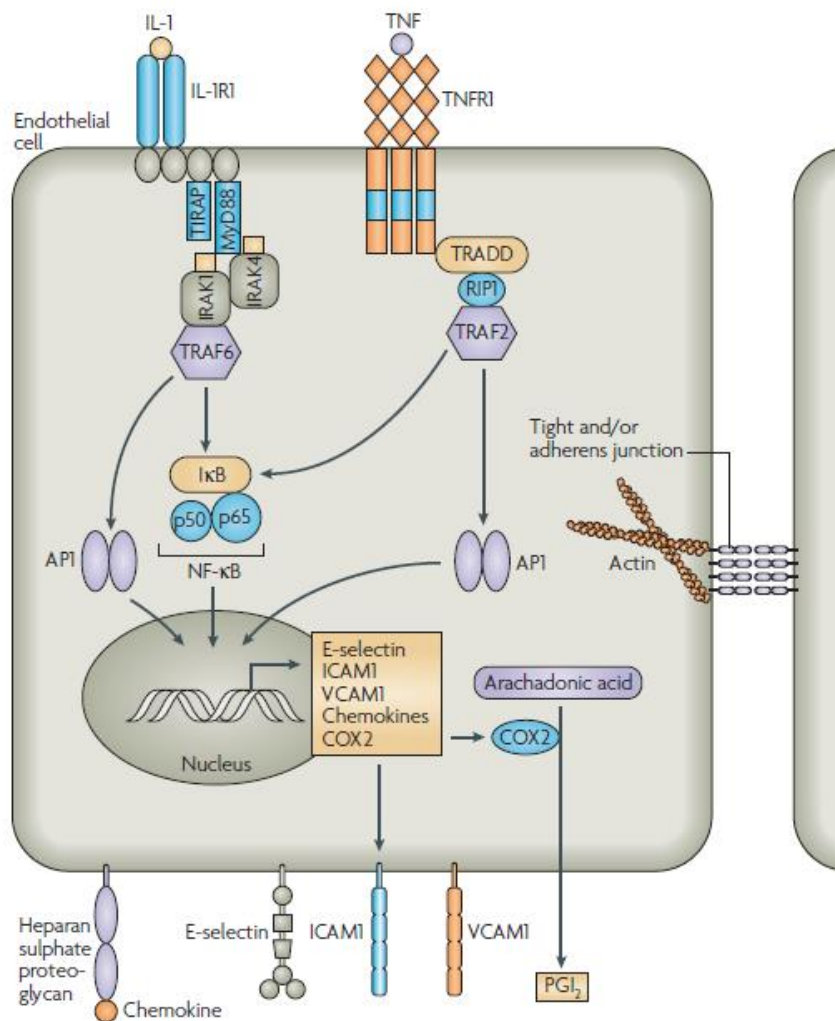


Figure 6 : Mécanismes intracellulaires de l'activation endothéliale de type II (d'après Pober et Sessa 2007).

Une activation de la cellule endothéliale par le TNF- α induit le recrutement de la protéine TRADD (TNFR-associated via death domain protein) sur le TNFR1. TRADD va alors former un complexe comprenant la protéine RIP1 (Receptor-Interacting Protein 1) et la protéine TRAF2 (TNFR Associated Factor 2). Dans le cas d'une activation par la cytokine inflammatoire IL-1, la formation d'un complexe de signalisation associé au récepteur IL1R1 est initiée par la fixation, sur la partie cytosolique du récepteur activé, de la protéine MyD88 (Myeloid differentiation primary response gene 88) et TIRAP (Toll/IL-1 receptor accessory protein). MyD88 va alors se dissocier rapidement du récepteur et interagir avec les protéines IRAK1 et 4 (IL-1R associated kinase 1). Le signal pro-inflammatoire induit par ces cytokines, entraîne donc la formation de complexes de signalisations intracellulaires conduisant à la transcription de nouveaux gènes *via* NF- κ B (Nuclear Factor κ B) et AP1 (Activating Protein 1) et à la synthèse de protéines caractéristiques de l'inflammation (Karmann *et al.*, 1996).

Parmi ces protéines nouvellement exprimées, on retrouve des protéines de l'adhésion des leucocytes, E-sélectine, ICAM-1 et VCAM-1, des cytokines (IL-1 β , IL-6, IL-8 ...), mais également des enzymes telles que la cyclooxygénase 2 (COX2) (Pan *et al.*, 1998).

De même que pour l'activation de type I, l'activation de type II induit les symptômes physiques de l'inflammation, vue en introduction. Cette seconde activation participe donc à l'augmentation du débit sanguin, à la fuite des protéines plasmatiques vers le tissu en permettant le relâchement des jonctions serrées ainsi qu'à l'augmentation du recrutement des leucocytes sur le site de l'inflammation. En effet, comme il l'a été abordé dans le paragraphe précédent l'activation endothéliale de type II est à l'origine de la synthèse *de novo* de l'enzyme cyclooxygénase COX2. Cette enzyme va agir en synergie avec COX1 et augmenter la catalyse de l'acide arachidonique en prostaglandine I₂, augmentant la quantité du vasodilatateur distribué aux cellules musculaires lisses et donc favoriser la dilatation du vaisseau (Zavoico *et al.*, 1989). De même, la stimulation par le TNF- α ou l'IL-1 entraîne une réorganisation du cytosquelette de la cellule entraînant l'ouverture des espaces intercellulaires (Petrache *et al.*, 2003 ; Pober et Cotran, 1990). Cependant, cette réorganisation de l'actine au sein de la cellule est NF- κ B dépendante, et dépend également de la synthèse de protéine au contraire du mécanisme d'ouverture des jonctions de l'activation de type I. Une fois les jonctions intercellulaires ouverte, une fuite de protéines plasmatique, du sang vers le tissu à lieu. Ces protéines plasmatiques vont alors s'associer afin de former une matrice supportant la migration et la survie des neutrophiles (Frangogiannis, 2006). Enfin, le recrutement des leucocytes sur le site de l'inflammation est une étape importante de la régulation, du contrôle et de la résolution de l'inflammation.

C'est pourquoi la mobilisation des leucocytes est plus efficace lors d'une activation endothéliale de type II que de type I. En effet, la synthèse de nouvelles molécules et leur présentation à la surface de la cellule, telles que les molécules d'adhésion VCAM-1 ou E-sélectine (Ley et Reutershan, 2006) mais encore des cytokines telles que l'IL-8 octroie à la cellule endothéliale une plus grande efficacité dans sa capacité à recruter les leucocytes.

1-b Rôle de la cellule endothéliale au cours du rejet humoral

Au cours de l'AMR, les CE vasculaires et notamment les CE de la microvasculature sont la cible principale des DSA. Les anticorps vont pouvoir entraîner un endommagement direct de

l'endothélium des capillaires, *via* une réorganisation du cytosquelette de la CE et la mise en place des mécanismes de prolifération cellulaire et de survie cellulaire qui participent à la pathogénèse de l'AMR (Ziegler *et al.*, 2012). Les DSA peuvent également endommager la cellule de façon indirecte par la fixation du complément ou le recrutement des cellules de l'inflammation qui possèdent le récepteur Fc (Figure 7). Ainsi lors du rejet, la fixation d'anticorps anti-HLA associée au complément est à l'origine de la lyse et de la mort de la cellule endothéliale *via* le complexe d'attaque membranaire MAC (voir partie II-2 : le complément) (Farkash et Colvin, 2012).

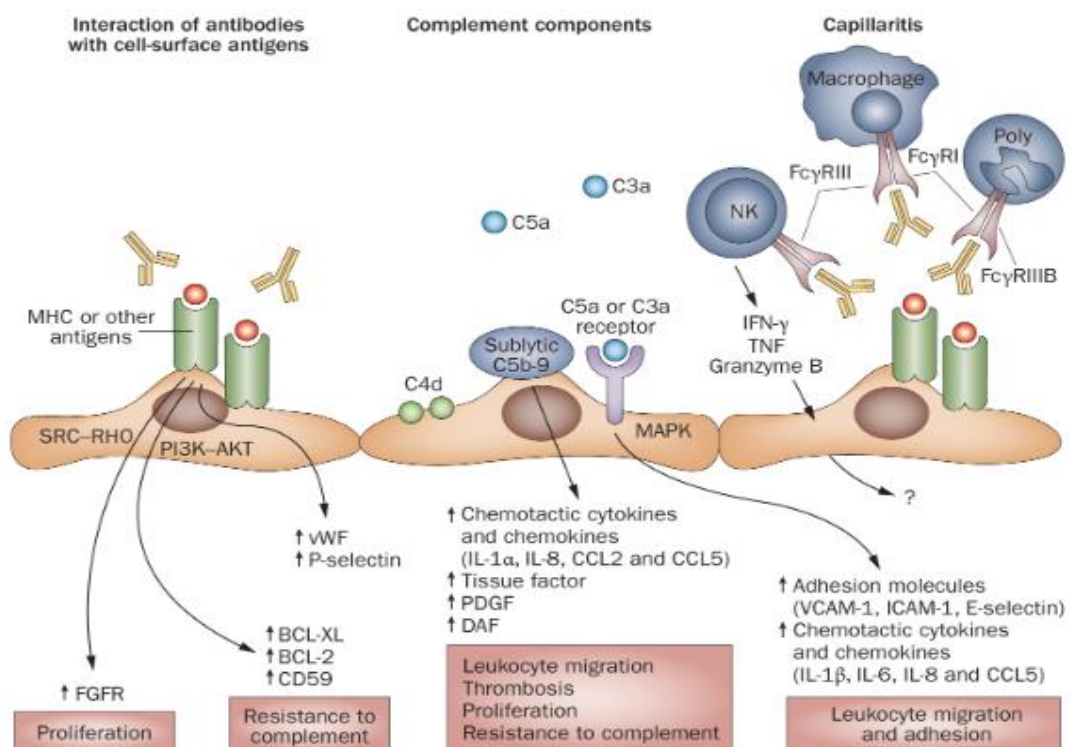


Figure 7 : Interaction de la cellule endothéliale avec les autres médiateurs du rejet humoral. L'interaction avec chacun des médiateurs de l'AMR entraîne la régulation de molécules spécifiques au sein de la cellule endothéliale et un effet délétère pour l'intégrité du greffon (d'après Farkash et Colvin, 2012).

Bien que la CE possède la capacité d'éliminer de la surface de sa membrane le complexe MAC présent en quantité sub-lytique, si le nombre de complexes dépasse la capacité de suppression de la CE alors la mort osmotique de la cellule est inévitable. (Papadimitriou *et al.*, 1991 ; Tegla *et al.*, 2011). La mort de la CE conduit à la rétraction de son cytoplasme, et au détachement de la cellule ce qui participe à la fuite de fluide intravasculaire et entraîne la mise à nue de la matrice sous endothéliale. Cet évènement va déclencher l'activation des mécanismes de coagulation et d'agrégation plaquettaire

permettant, en condition normale, la restauration de la paroi vasculaire. En condition d'AMR, ces mécanismes causent l'obstruction de la microvasculature pouvant conduire à l'ischémie du greffon (Racusen et Haas, 2006).

Cependant, si la stimulation de la CE par les DSA et le complément présente une intensité modérée, la cellule va alors se trouver dans des conditions d'activations sub-lytiques. Dans cet état d'activation, la CE va subir un changement de morphologie, *via* un changement de la conformation de son cytosquelette, par la formation de fibres de stress trans-cellulaire. La CE va ainsi passer d'une forme polygonale et plate à une forme contractée et gonflée. Cette modification de la morphologie conduit à un élargissement des espaces intercellulaires et de ce fait une perte de la fonction de la barrière endothéliale, avec un endothélium plus permissif (Dudek et Garcia, 2001).

III- Les effecteurs humoraux de l'AMR

1- Les anticorps anti-HLA et non-HLA : origine et impact dans l'AMR

1-a HLA de classe I

Le cluster de gènes HLA-I code pour les molécules classiques du HLA-I (HLA-A, HLA-B et HLA-C) également appelé chez l'homme Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH). Les molécules du HLA jouent un rôle important dans la détection et l'élimination de cellules infectées par un virus, de cellules tumorales ou de cellules allogéniques transplantées. Le cluster HLA-I code également pour les molécules du HLA-I dites non classiques HLA-1b (HLA-E, HLA-F et HLA-G). La structure du HLA-I consiste en une chaîne lourde α , composée de 3 domaines extracellulaires, $\alpha 1$, $\alpha 2$ et $\alpha 3$ codés par des gènes localisés sur le chromosome 6, liée de manière non-covalente à une molécule de $\beta 2$ -microglobuline, codée par des gènes présents sur le chromosome 15. La $\beta 2$ -microglobuline assure le maintien de la conformation et donc la stabilité du complexe HLA-I/peptide à la surface de la membrane. Les gènes HLA de classe I représentent les loci les plus polymorphiques du génome humain ($n = 10\,730$, mai 2016, hla.alleles.org) entraînant la possibilité pour ce système de présenter aux LT cytotoxiques CD8 une grande variété de complexes HLA/peptides antigéniques endogènes. Le polymorphisme HLA-I est principalement porté par les exons 2 et 3 codant pour le

domaine $\alpha 1$ et $\alpha 2$. Ces domaines forment le sillon peptidique dans lequel est ancré le peptide antigénique du soi présenté par le HLA-I et qui sera reconnu par le LT CD8. Les molécules HLA-I sont exprimées à un niveau basal dans toutes les cellules nucléées. Cependant, sous certaines conditions telles qu'une infection, un cancer ou encore une inflammation, cette expression peut être régulée de façon positive ou négative (Neefjes *et al.*, 2011).

1-b HLA de classe II

Les gènes du HLA-II codent pour les molécules HLA-DP, -DQ et -DR exprimées à la surface de la cellule sous forme d'un hétérodimère de deux chaînes polypeptidiques, une chaîne α et une chaîne β . Ces deux chaînes, chacune constituée de deux domaines, respectivement $\alpha 1$ et $\alpha 2$, $\beta 1$ et $\beta 2$, sont associées de façon non-covalente. Les molécules du HLA-II sont essentielles à l'initiation de la réponse immunitaire mais peuvent également être impliquées dans différents désordres et maladies autoimmunes. A la différence des molécules du HLA-I, l'expression des molécules du HLA-II est restreinte aux cellules présentatrices d'antigènes professionnelles. Le HLA-II a pour fonction la présentation de peptides exogènes aux LT CD4, il est le système essentiel à la reconnaissance du non-soi par les cellules effectrices de l'immunité adaptative (Neefjes *et al.*, 2011).

Ainsi, les peptides portés par les HLA-I ou -II vont être reconnu par le récepteur des cellules T, le TCR (T Cells Receptor), créant ainsi une interaction tri-moléculaire spécifique HLA/Peptide/TCR cruciale pour la génération d'une réponse immunitaire antigène spécifique.

1-c Les anticorps anti-HLA

Le développement des anticorps anti-HLA est un mécanisme dépendant des LT et débute lorsqu'un individu receveur (transplantation, transfusion sanguine, grossesse) est exposé à des protéines HLA allogénique. Les cellules lymphocytaires B naïves expriment à la surface de leur membrane, suite à un réarrangement VDJ effectif, des immunoglobulines. Ces LB naïfs émergent de manière continue de la moelle osseuse et vont circuler à travers les organes lymphoïdes secondaires. Lorsqu'une immunoglobuline exprimée à la surface du LB naïf reconnaît un antigène contre lequel il est spécifique, dans ce cas une molécule du HLA

allogénique, le complexe Ig-HLA allogénique est internalisé par la cellule. La molécule du HLA va ensuite être processée et va finalement retourner à la surface de la cellule sous forme de peptides, présenté par une molécule HLA de classe II de l'hôte. Ce LB naïf ayant processé l'antigène HLA allogénique devient pleinement activé suite à une interaction avec un LT appelé "helper" (Th) dont le TCR reconnaît le complexe HLA-II/peptide exposé par le LB. L'interaction avec des molécules de co-stimulation tel que CD40 ligand (CD40L) exprimé par le LT et son récepteur, CD40, exprimé par le LB associé à l'action de cytokine produite par le LT, vont finaliser l'activation du LB et entraîner la formation de centres germinatifs. Au cœur du centre germinatif, les LB activés vont rapidement se diviser et subir une hypermutation somatique, une maturation de leur affinité et un changement d'isotypes des Ig qu'ils produisent. Quelques clones ayant une forte affinité pour l'alloantigène se différencient en LB mémoire ayant une longue durée de vie, ou en cellules plasmocytaires, sécrétrices d'anticorps ; les anticorps produits par ces cellules pré- ou post-transplantation constituent la large famille des anticorps anti-HLA également appelés DSA et sont susceptible d'entraîner un rejet rapide de l'allogreffe (Montgomery *et al.*, 2011).

1-b-i rôle des DSA et pathogénèse du rejet humoral

Bien que l'ensemble des DSA, dirigés contre le HLA-I et le HLA-II, soit considéré comme délétères pour la vascularisation du greffon, les travaux scientifiques des dix dernières années ont permis de souligner l'association entre anticorps anti-HLA-II et présence de lésions de l'allogreffe, que ce soit en transplantation rénale (Lefaucheur *et al.*, 2011, 2010) ou cardiaque (Smith *et al.*, 2011). Dans ces configurations de transplantation, la présence de DSA dirigés contre les antigènes HLA-II, montre une prévalence importante associée à une dysfonction de l'organe transplanté (Issa *et al.*, 2008).

Ainsi, ces DSA, *de novo* ou préformés vont avoir pour premières cibles les CE et les molécules du HLA-II exprimées par ces cellules. En effet, *in vitro*, les CE de la microvasculature expriment les trois antigènes de classe II en réponse à un stimulus pro-inflammatoire tel que l'IFN- γ ou *via* l'interaction avec des cellules du système immunitaire allogénique telles que les cellules Natural Killer (Watson *et al.*, 1995).

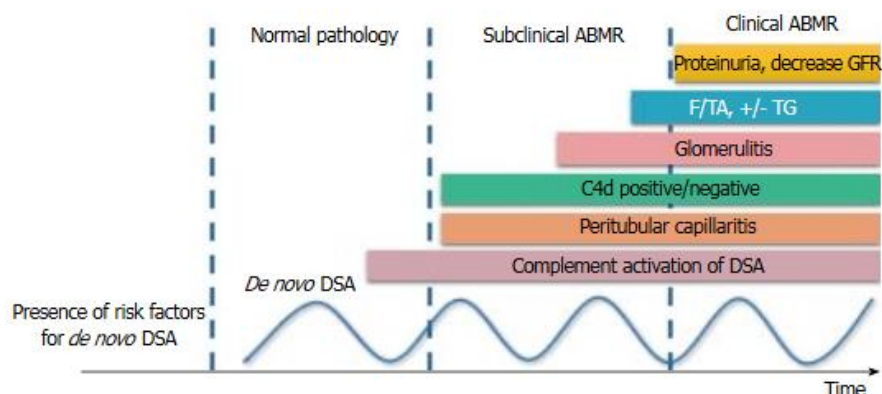


Figure 8 : Représentation des étapes du développement de l'AMR rénale en fonction du temps post greffe et des différentes phases de la pathologie, normale, sub-clinique et clinique (d'après Townamchai *et al.*, 2015).

C'est pourquoi, les symptômes histologiques et cliniques du rejet en présence de DSA sont associés notamment à une atteinte du système vasculaire du greffon, des plus gros vaisseaux jusqu'à la microvasculature et les capillaires. Durant la période post-transplantation, l'apparition répétée de DSA *de novo* entraîne l'activation du complément et l'entrée dans la phase sub-clinique de la pathologie (Figure 8) (Loupy *et al.*, 2015b, 2013). Dans cette phase asymptomatique seule les biopsies contrôles post-greffe permettent le diagnostic du rejet aigu humoral. La pathogénèse se poursuit et donne lieu à l'observation d'un gonflement et un détachement des CE, une capillarite péri-tubulaire, un dépôt de C4d à la surface de l'endothélium, une glomérulite, une infiltration de neutrophiles, une fibrose interstitielle (IF, interstitial fibrosis) et une atrophie des tubules rénaux (TA, tubular atrophy) entraînant une glomérulopathie du greffon (TG, transplant glomerulopathy). La glomérulopathie signe l'entrée dans la phase de détection clinique de l'AMR par une augmentation de la protéinurie et une diminution de l'efficacité de la filtration glomérulaire (Townamchai *et al.*, 2015). Un profil similaire de l'inflammation endothéliale est observé dans des cas de greffe de cœur et poumons en présence de DSA (Kobashigawa *et al.*, 2011 ; Wallace *et al.*, 2014).

Dans un contexte de transplantation cardiaque, les anticorps anti-HLA présents de manière précoce et persistante sont associés à un mauvais pronostic de survie et au développement d'une vasculopathie d'allogreffe cardiaque (CAV) (Loupy *et al.*, 2016).

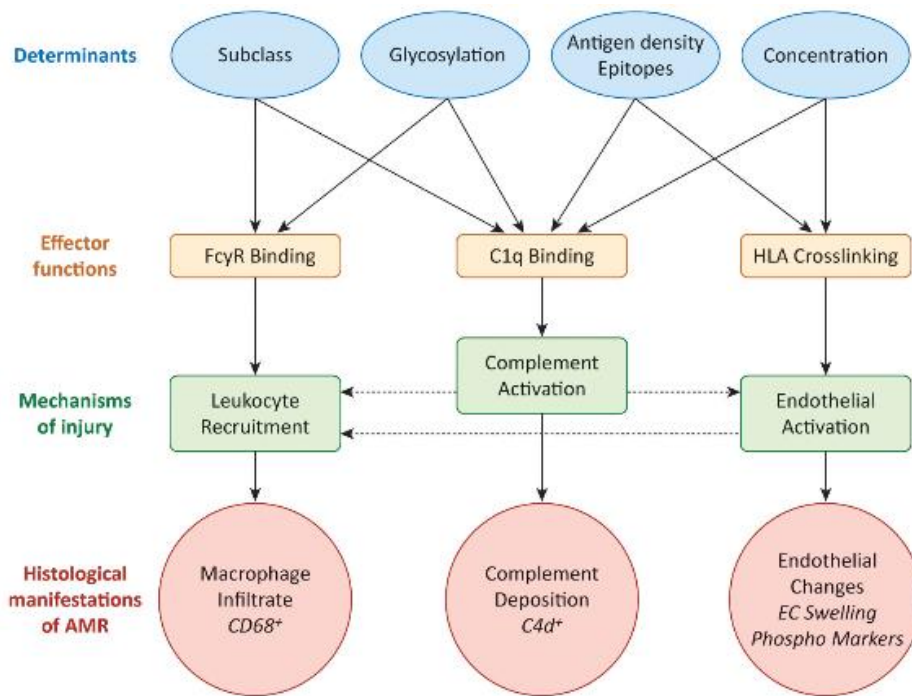


Figure 9 : Impact de la présence de DSA post-transplantation dans la pathogénèse du rejet aigu humoral (d'après Thomas *et al.*, 2015).

Comme le montre Thomas, l'impact de la présence des DSA post-transplantation dépend de différents facteurs tels que la sous classe des DSA (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 ou IgM), son statut de glycosylation, la densité des épitopes antigéniques présents et la concentration de ces DSA. Selon ces 4 facteurs, les DSA peuvent agir de trois façons différentes et de manière active ou passive. En effet, les anticorps peuvent : être reconnus par une cellule exprimant le récepteur des fragments Fc des anticorps, fixer la molécule C1q du complément ou se fixer à une molécule du HLA exprimée par une cellule allogénique. Ainsi, les DSA peuvent induire l'activation du complément, l'activation de la cellule endothéliale ou encore le recrutement de leucocytes. Chacun de ces trois mécanismes peut être observé par histologie et/ou immunohistochimie sur les biopsies contrôles et participent au diagnostic du rejet aigu humoral (Thomas *et al.*, 2015) (Figure 9).

1-c Les anticorps non-HLA

Bien que le rejet humoral soit de façon générale médié par la présence de DSA, de précédentes études supportent également le rôle délétère d'anticorps non dirigés contre les molécules HLA (non-HLA) (pour revue Delville *et al.*, 2016 ; Opelz and Collaborative Transplant Study, 2005). Ainsi, en transplantation rénale, il a été observé chez certains patients, post-transplantation, une dysfonction de la fonction rénale en présence de lésions histologiques caractéristiques de l'AMR en absence de DSA avec des conséquences importantes sur le pronostic, à court et long terme, de la survie du greffon (Jackson *et al.*, 2012). Ces anticorps, se fixent à l'endothélium et entraînent l'apoptose des CE, par un système indépendant de l'activation du complément. Plusieurs cibles antigéniques des anticorps non-HLA ont d'ores et déjà été identifiées telles que les protéines MIC (MHC class I-related chain), MICA et MICB (Sumitran-Holgersson *et al.*, 2002), le récepteur de type 1 à l'angiotensine II (AT1R) (Dragun *et al.*, 2005), le récepteur de type A à l'endothéline 1 (Hiemann *et al.*, 2012) ou encore la vimentine. La vimentine, est une protéine de type III des filaments intermédiaires du cytosquelette synthétisée par les cellules endothéliales endommagées, les cellules musculaires lisses en prolifération, les fibroblastes et les leucocytes et est considéré comme le plus abondant des antigènes immunoréactif de la CE (Carter *et al.*, 2005). Le titrage à un et deux ans post-greffe des anticorps anti-vimentine prédit le développement ou non d'une CAV (Jurcevic *et al.*, 2001). Ces anticorps sont associés à un mauvais pronostic et un faible taux de survie du greffon dans le cas d'une transplantation cardiaque (Ferry *et al.*, 1997 ; Fredrich *et al.*, 1999). Les anticorps non-HLA anti-cellules endothéliales induisent des dommages vasculaires de façon complément indépendante (Dragun *et al.*, 2013). Cependant, l'induction de voies de signalisation intracellulaire liées à la fixation de l'anticorps sur sa cible antigénique est capable d'entraîner une apoptose des CE (Le Bas-Bernardet *et al.*, 2003) et une thrombose du greffon (Amico *et al.*, 2008). Toutefois, la présence de ces anticorps post-transplantation pourrait être un épiphénomène, s'ajoutant aux DSA ou aux lésions déjà présente sans y participer de manière active (Dragun *et al.*, 2005) mais pourrait également constituer les effecteurs principaux du rejet. Mais, sans une connaissance approfondie des mécanismes qu'ils induisent dans l'endothélium, il est difficile de juger si les anticorps détectés au moment du rejet constituent des biomarqueurs des lésions induites antérieurement ou s'ils participent de

façon active aux dommages induits au greffon (Delville *et al.*, 2016). C'est pourquoi l'étude de la nature et de l'implication des anticorps non-HLA et anti-cellules endothéliales au cours du rejet humoral est également important, afin d'identifier toutes les cibles potentielles du système immunitaire du receveur pouvant conduire à la perte du greffon.

2- Le complément : activation de la voie classique et synthèse du C4d

Le système du complément est un composant important de l'immunité innée dont la fonction primaire est de constituer une ligne de défense contre les pathogènes (Noris et Remuzzi, 2013).

Au cours de l'AMR, l'activation du système du complément représente une cause majeure des dommages induits aux tissus de l'allogreffe. L'activation du complément génère une réponse inflammatoire forte et entraîne la fixation, notamment à la surface des cellules endothéliales, de fragments solubles du complément. L'activation de la cascade du complément dans l'allogreffe peut être induite par un épisode d'ischémie au moment de la transplantation, mais également par la reconnaissance d'allo-antigènes (i.e principalement HLA-I et HLA-II) par des DSA lors d'épisodes d'AMR aigu ou chronique (El Ters *et al.*, 2013). Il existe 3 voies d'activation du système du complément, la voie classique, la voie des lectines, et la voie alternative. Dans la suite de ce manuscrit, seule la voie classique du complément sera abordée.

Dans un contexte d'activation de la voie classique dépendant des anticorps, la tête globulaire de la molécule du complément C1q se fixe au segment Fc des complexes multivalents IgG-antigènes ou au segment Fc d'une IgM ayant reconnue un antigène (Nayak *et al.*, 2012). Le C1q est également capable d'entraîner une activation anticorps indépendante du système du complément en reconnaissant d'autres ligands tels que des PAMPs (Pathogens Associated Molecular Pattern) présents à la surface de certaines bactéries, virus, parasites ou mycoplasmes. Le recrutement de la molécules C1q constitue la première étape de la cascade d'activation du complément (Figure 10). A la suite de la fixation C1q-ligand, C1r, sous-unité de C1q s'auto-active et va cliver C1s sous-unité également, qui à son tour va pouvoir cliver C4 donnant deux nouveaux fragments, C4a et C4b. Le nouveau fragment C4b va pouvoir se fixer de manière covalente à la cible présentant à sa surface l'antigène reconnu. La protéine C2 du complément va se fixer au C4b et être cliver à son tour par C1s, ce qui va générer un nouveau fragment, le C2a, une serine protéase active qui va se lier au C4b afin de constituer la C3 convertase (C4b2a) (Muller-Eberhard *et al.*, 1967). La C3 convertase va, comme son nom l'indique, convertir la protéine C3 en fragments C3a C3b qui est l'opsonine majeure du système du complément et qui, comme

C4b, va se coupler de manière covalente à la cellule cible. Le lien entre le rejet et le complément a été renforcé par Feucht, (Feucht *et al.*, 1993, 1991) qui a démontré la présence d'un produit de clivage du complément, le C4d, dans des biopsies de transplant, impliquant la voie classique du complément dans le rejet aigu et chronique. Cette observation a permis de mettre en lumière que le C4d constitue un biomarqueur diagnostique du rejet aigu humoral.

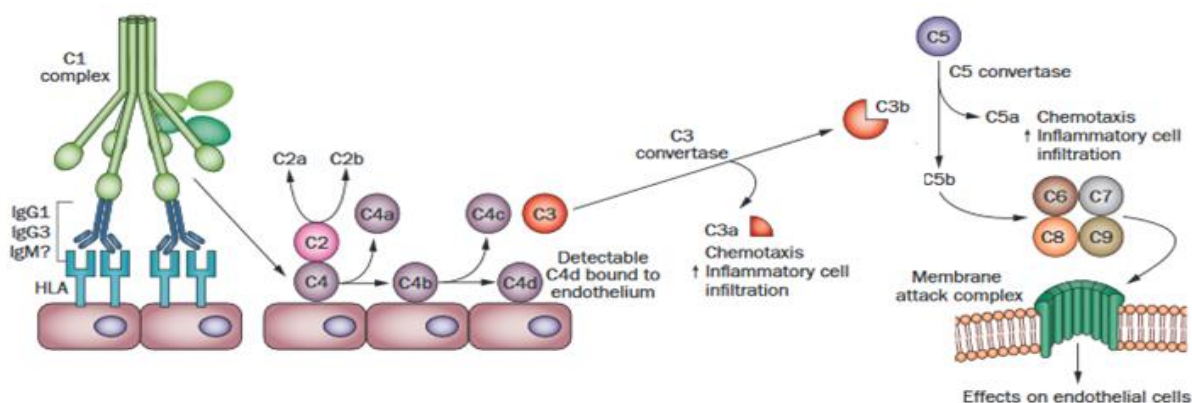


Figure 10 : Cascade d'activation du complément conduisant au dépôt de C4d à la surface de la cellule endothéliale (d'après Stegall *et al.*, 2012).

La dernière étape de l'activation du système du complément est initiée lorsqu'un seuil de fragments C3b présent à la surface de l'activateur est atteint. Ainsi la C3 convertase va pouvoir recruter une molécule du C3b est former le complexe C4b2a3b, ou C5 convertase de la voie classique. La C5 convertase va pouvoir par la suite, *via* le clivage de C5, générer le fragment C5a qui est un chimioattractant des macrophages et le fragment C5b. Ce dernier va pouvoir s'associer aux protéines du complément C6, C7, C8 et plusieurs molécules C9 afin de former le complexe (C5bC6C7C8)C9n également connu comme le complexe d'attaque membranaire (MAC) (Stegall *et al.*, 2012). La protéine de liaison au C4 (C4-binding protein, C4BP) est une protéine régulatrice de la voie classique et de la voie des lectines dirigé contre le fragment C4b du complément. C4BP, qui peut agir en parallèle aux événements conduisant à la formation du complexe MAC, est un co-facteur permettant le clivage de C4b en C4c et C4d. Ainsi, lors de l'AMR le C4d va se fixer de façon covalente à l'endothélium est constitué un biomarqueur du rejet humoral (Feucht *et al.*, 1991).

Ces fragments solubles se révèlent utiles en clinique en tant que marqueurs de l'inflammation. En effet, la détection des protéines du complément déposées à la surface de l'endothélium du tissu transplanté est devenue un biomarqueur indispensable au diagnostic de l'AMR (Berry *et al.*, 2013).

PARTIE II

Les macrophages : Différenciation, polarisation, fonction.

I- Les macrophages

Les macrophages ont été identifiés pour la première fois par Ilya Metchnikoff il y a plus de 100 ans et dont la description du mécanisme de la phagocytose lui valut d'obtenir le prix Nobel de médecine en 1908. Les macrophages sont les cellules présentant la plus grande diversité fonctionnelle (plasticité) parmi les cellules du système hématopoïétique. Ils sont retrouvés dans tous les tissus et leurs principales fonctions sont de défendre l'organisme face à l'apparition d'un pathogène et de moduler la réponse immunitaire adaptative *via* la présentation des antigènes, exogènes ou endogènes, par les molécules du HLA-I et -II.

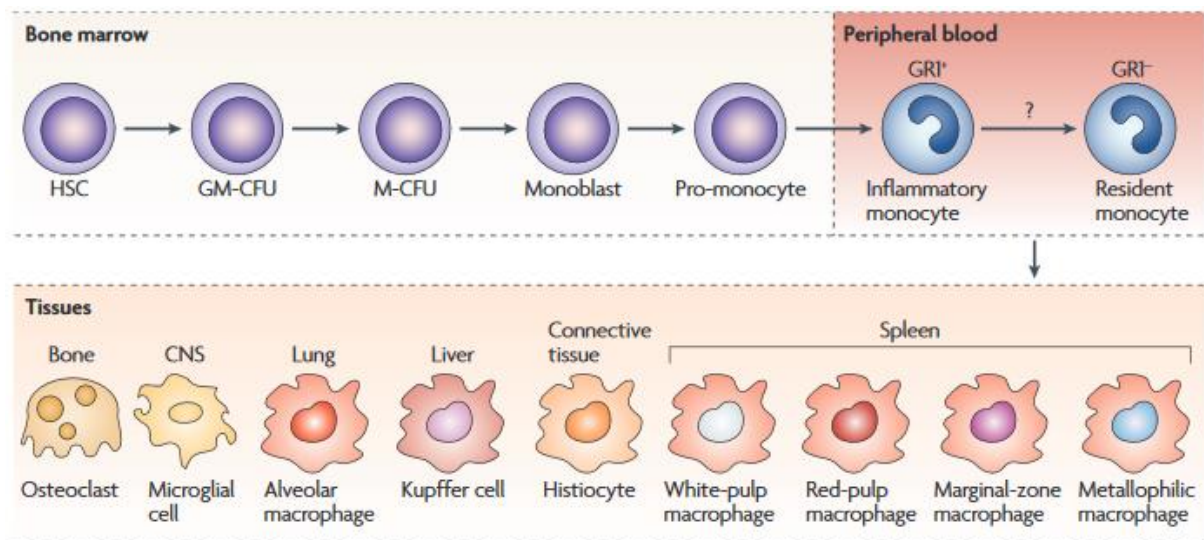


Figure 11 : Hétérogénéité de la population macrophagique et dénomination selon le tissu de résidence (d'après Mosser et Edwards 2008). Les monocytes proviennent d'une cellule souche hématopoïétique (HSC) commune de la moelle osseuse. Ils vont subir différentes étapes de différenciations et devenir successivement des granulocytes macrophages colony-forming unit (GM-CFU) puis des monocytes colony-forming unit (M-CFU). En réponse au macrophage colony stimulating factor (M-CSF) ils se différencient en monoblast puis pro-monocytes et enfin monocytes. Les monocytes quittent alors la moelle osseuse pour entrer dans la circulation sanguine qu'ils quitteront rapidement pour entrer dans le tissu où ils résideront et se différencieront.

Les macrophages sont des cellules d'origine monocyttaire différenciées en réponse à des facteurs de différenciations tels que le granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) ou le macrophage colony stimulating factor (M-CSF) (Figure 11). Cette différenciation du monocyte en macrophage entraîne une modification génotypique ayant pour conséquence un changement de l'expression de différents gènes ainsi qu'une modification de la longévité de la cellule. En effet, à la différence des monocytes, les macrophages présente une durée de vie, après différenciation, pouvant aller du mois à plusieurs années (Parihar *et al.*, 2010 ; van Furth et Cohn, 1968).

Parmi les changements phénotypiques observables après différenciation, Taylor a pu montrer une augmentation de l'expression de CD11b, une intégrine alpha-M permettant de réguler l'adhésion et la phagocytose, du mannose récepteur CD206 ainsi que des récepteurs FcγR, reconnaissant les fragments Fc des anticorps (Taylor *et al.*, 2005). De plus, lors de la maturation du monocyte en macrophage il a été montré une inhibition de l'expression des molécules du HLA-I au profit d'une plus forte expression de molécules du HLA-II (Waldburger *et al.*, 2001). Les autres fonctions du macrophage, en plus de leurs capacités de présentation antigénique, sont centrées sur l'induction et la résolution de l'inflammation, ainsi que sur la réparation tissulaire (Mosser et Edwards, 2008).

1- Les macrophages M1/M2

Premièrement qualifiés de macrophages "classiques" (Nathan *et al.*, 1983) ou "alternatifs" (Stein *et al.*, 1992) selon leur induction respectivement par l'IFN-γ et le lipopolysaccharide (LPS) ou l'IL-4, la classification des macrophages évoluera dans les années 2000 pour devenir celle que nous connaissons aujourd'hui : la nomenclature M1 (classique) ou M2 (alternatif) (Mills *et al.*, 2000).

Cette classification a pour origine l'observation d'une différence dans la métabolisation de l'arginine par les macrophages dans des lignées de souris possédant un fond génétique favorisant une réponse T helper de type 1 (Th1) ou T helper de type 2 (Th2). En effet, les macrophages issus des souris Th1, dont les LT produisent principalement de l'IFN-γ, montrent un type d'activation au cours de laquelle l'arginine est dégradée en NO contre une dégradation en ornithine pour les macrophages issus des souris Th2 possédant des LT produisant principalement de l'IL-4 ainsi que du TGF-β1. (Mills *et al.*, 2000). Cette découverte a conduit à un consensus dans la communauté scientifique quant à la classification et aux rôles associés des macrophages M1 et M2. De cette façon il a été attribué aux macrophages M1 (activation classique) des fonctions inflammatoires au contraire des macrophages M2 (activation alternative) remplissant des fonctions anti-inflammatoires. En 2004, Mantovani *et al.*, précisent cette classification en divisant les macrophages M2 en 4 sous classes M2a, M2b, M2c et M2d basées sur le stimulus de différenciation *in vitro* ainsi que les changements dans le programme transcriptionnel (Mantovani *et al.*, 2004) (Figure 12).

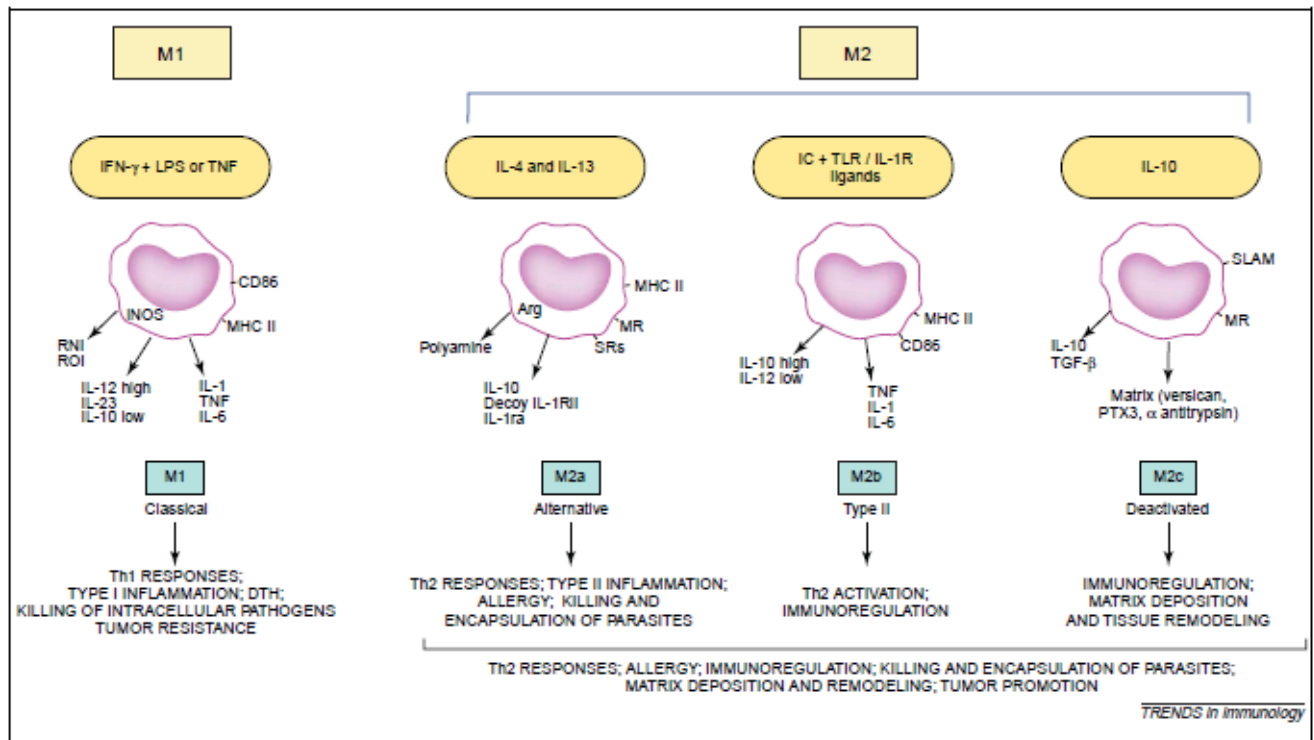


Figure 12 : Polarisation *in vitro* et classification des macrophages pro-inflammatoires (M1) et anti-inflammatoires (M2) (d'après Mantovanni *et al.*, 2004).

Cependant, la classification des macrophages en M1/M2 est désormais considérée comme une approche simplifiée qui ne reflète pas de manière adéquate le spectre de la population des macrophages. Pour exemple, l'identification des TAMs (Tumor Associated Macrophages) qui n'entre pas de manière stricte dans les critères de classification M1 ou M2 et peuvent être différenciés à la fois par des chimiokines pro- ou anti-inflammatoire (Röszer, 2015).

Lors de la polarisation du macrophage en M1 ou M2, un réseau de facteurs de transcription et de régulateurs post-transcriptionnels est impliqué (Sica et Mantovani, 2012). Des protéines telles que le signal transducer and activators of transcription (STAT), l'Interferon regulatory factor (IRF), le suppressor of cytokine signaling (SOCS) sont essentielles pour l'orientation de la polarisation dans un phénotype M1 ou M2. Ainsi la voie de signalisation STAT/IRF induite par l'IFN-γ et/ou l'activation de toll-like receptor (TLR) guide la polarisation du macrophage vers une voie d'activation en M1 *via* STAT1. De même, les molécules HIF (Hypoxia Inducible Factors), HIF-1α et HIF-2α jouent un rôle dans la polarisation M1/M2.

En effet, HIF-1 α régule *NOS2* et donc l'état de polarisation M1 alors que HIF-2 α régule l'expression de l'arginase 1 et donc l'état de polarisation M2 (Takeda *et al.*, 2010) (Figure 13).

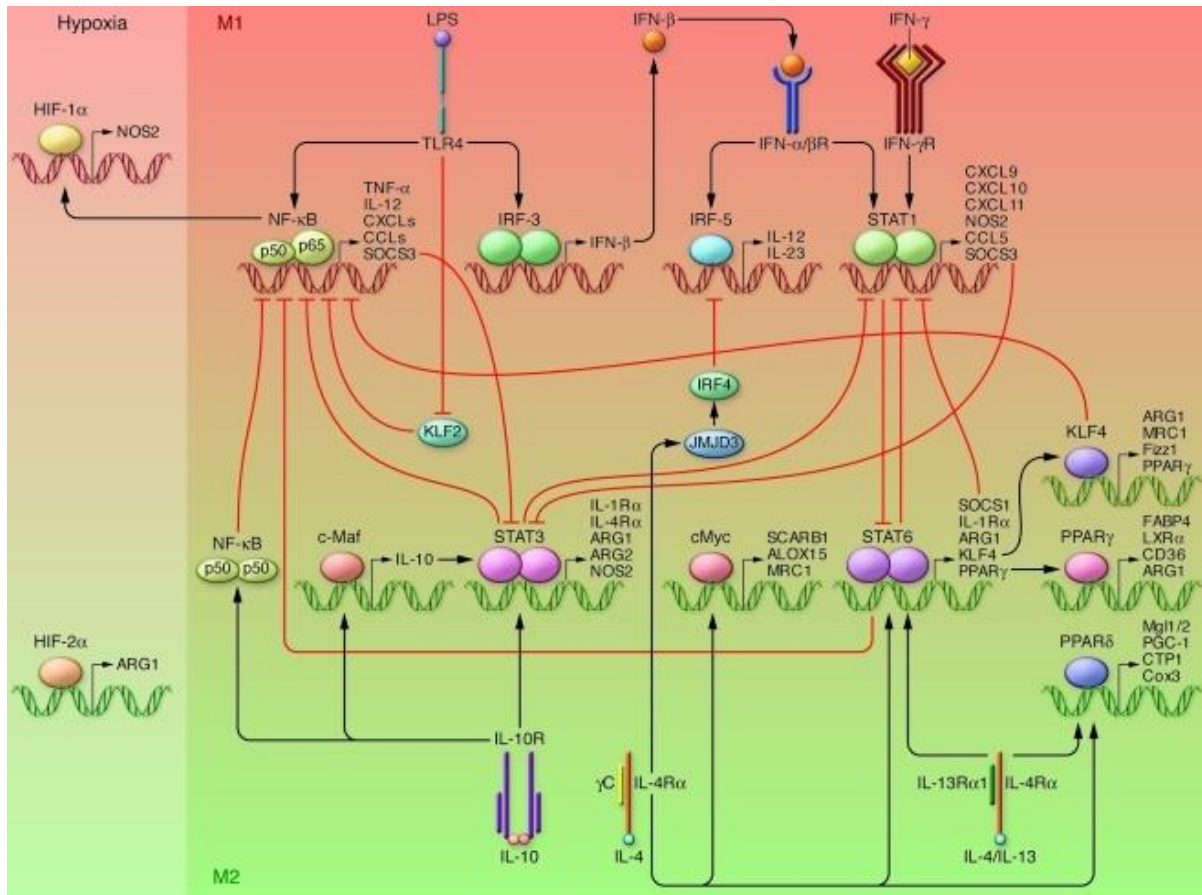


Figure 13 : Mécanismes transcriptionnels de la polarisation des macrophages M1 et M2 (d'après Sica et Mantovani, 2012).

Cependant, de façon intéressante, et démontrant encore une fois les capacités uniques des macrophages, il a été récemment montré, *in vitro*, la capacité des macrophages à se repolariser complètement d'un macrophage M2 vers un macrophage M1 dépendamment de l'environnement en chimiokines (Davis *et al.*, 2013). Cette réversion de la polarisation est un mécanisme rapide qui nécessite la réorganisation des différents réseaux de signalisation à la fois au niveau de la transcription et de la traduction de la cellule.

1-a Les macrophages pro-inflammatoires M1

Les macrophages M1, induits par le LPS et l'IFN- γ , sont caractérisés par la capacité de produire une quantité très importante de cytokines pro-inflammatoires, permettant de conférer une résistance aux pathogènes et possédant un rôle antimicrobien puissant. Les M1 possèdent également la capacité de produire des dérivés azotés tels que le NO ainsi que des dérivés de l'oxygène tel que les ROS et de médier la réponse Th1. Il a été montré chez le macrophage M1 une augmentation de la régulation du facteur de transcription IRF5, crucial pour la polarisation et l'induction des cytokines IL-12, IL-18, IL-23 et TNF- α (Krausgruber *et al.*, 2011). Cette libération de cytokines pro-inflammatoires aide à la mise en place d'une réponse inflammatoire spécifique de l'antigène dans laquelle participe les cellules Th1 et Th17. La voie du LPS/TLR4 joue également un rôle important dans la polarisation du macrophage par l'activation de STAT1- α/β de façon indépendante de MyD88 (Toshchakov *et al.*, 2002). D'autres molécules sont impliquées dans l'induction du M1 telles que le récepteur couplé aux protéines G, P2Y(2)R, participant à l'induction du NO *via* NOS2 (Eun *et al.*, 2014), la protéine intracellulaire de suppression de la signalisation des cytokines (SOC3), qui participe à l'activation des voies de signalisations NF- κ B et Pi3K elles-mêmes impliquées dans la production du NO (Arnold *et al.*, 2014) mais également l'Activin A qui participe à la promotion des marqueurs M1 et à la diminution de l'expression de l'IL-10 (Sierra-Filardi *et al.*, 2011). Du point de vue phénotypique, les macrophages M1 sont caractérisés par l'expression forte des molécules du HLA-II, l'expression de CD68, et de molécules de co-stimulation telles que CD80 et CD86. Il a également été montré, une activation de la nitric oxyde synthase (iNOS) permettant la production de NO à partir de la L-arginine (Arnold *et al.*, 2014 ; MacMicking *et al.*, 1997). Ainsi dans un contexte pathologique, les macrophages M1 sont impliqués dans l'initiation et le maintien de l'inflammation, pouvant conduire à une chronicité de la pathologie (Arthrite, athérosclérose, diabète, rejet chronique) (Fukuda *et al.*, 2012; Matsumoto *et al.*, 2016; van den Bosch *et al.*, 2016).

1-b Les macrophages anti-inflammatoires M2

Les macrophages M2 quant à eux, peuvent être activés par des agents infectieux, des complexes immuns, une infection par des helminthes, des molécules du complément, des corps apoptotiques, du MCSF, IL-4, IL-13, IL-10 ou du TGF- β . Cette activation induit la sécrétion de grande quantité d'IL-10 et plus faiblement d'IL-12. Il est désormais admis que la terminologie M2 fait référence à un groupe plus large de macrophages ne dépendant pas d'une activation unique mais classés selon le stimulus d'activation. Ainsi les macrophages M2 sont séparés en 4 sous classes distinctes M2a, M2b, M2c et M2d (Figure 12) (Mantovani *et al.*, 2004 ; Rőszler, 2015). Les macrophages M2a, sont induits par l'IL-4, l'IL-13, ou une infection par les champignons ou par les helminthes. Les macrophages M2b, sont induits par l'IL-1, des complexes immuns ou encore du LPS alors que les macrophages M2c sont induits par l'IL-10, le TGF- β et les glucocorticoïdes. Enfin, les macrophages M2d peuvent être induits par l'IL-6 ou de l'adenosine. Tous ces stimuli participent à la réponse de type Th2 et entraînent l'augmentation de l'expression de cytokines anti-inflammatoires et à la diminution de la production de cytokines pro-inflammatoires. Les macrophages M2 sont donc caractérisés par la production d'IL-4, une forte expression de l'IL-10 et de TGF- β . Ils possèdent également la capacité à promouvoir l'angiogenèse *via* l'expression de VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) et donc à participer à la tumorigénèse, à la réparation tissulaire par l'expression de métalloprotéinases (Luo *et al.*, 2006) ou encore de jouer un rôle important dans le contrôle et la réponse contre les parasites.

La production d'Arginase-1 est également une caractéristique distinctive des macrophages M2. Cette production d'Arginase 1 est dépendante de la transcription par STAT6, élément de la cascade de signalisation du récepteur à l'IL-4/IL-13. Le Krüppel-like factor 4 (KLF-4) participe, avec STAT6 à l'induction des gènes M2 comprenant l'*Arg-1*, *Mrc1*, *Fizz1* et *PPAR γ* , et inhibent les gènes M1 tels que *TNF α* , *Cox-2*, *CCL5* et *NOS2* (Figure 13). Cette régulation génétique pro-M2 passe par la séquestration de co-activateurs nécessaire à l'activation de la voie NF- κ B (Liao *et al.*, 2011). De plus, le récepteur nucléaire, peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) a été décrit comme impliqué dans la régulation des gènes participant au métabolisme oxydatif et à l'activation du phénotype M2 (Odegaard *et al.*, 2007). D'autres molécules ont été caractérisées comme jouant un rôle spécifique dans la

polarisation en macrophage M2, dont notamment la cytokine IL-21 polarisant le macrophage *via* la diminution de l'expression de *NOS2* et l'augmentation de la phosphorylation de STAT3 (Li *et al.*, 2013), mais également IRF4 (Martinovic *et al.*, 2005; Satoh *et al.*, 2010) ou encore BMP-7 (Rocher et Singla, 2013).

II- L'interaction monocyte/macrophage et endothélium

Lors de pathologies inflammatoires ou de dommages causés à l'endothélium, les monocytes vont être activés et recrutés sur le site de l'inflammation. L'augmentation de la production de la protéine MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1 ou CCL2) et de molécules ROS est caractéristique de cette étape d'activation du monocyte. De même, le MCP-1, sécrétée par les cellules endothéliales activées, améliore le recrutement des monocytes circulants à la surface de l'endothélium vasculaire et est l'un des premiers événements conduisant aux pathologies vasculaires (Martinovic *et al.*, 2005). En réponse, les monocytes ainsi recrutés vont se polariser en macrophages pro-inflammatoires M1, augmenter leur production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-8, l'IL-1 β ou le TNF- α et participer au maintien de l'inflammation locale. Il faut noter qu'une production trop importante de ces médiateurs solubles de l'inflammation a été associée à des dysfonctions importantes de différents organes (Lekkou *et al.*, 2004 ; Savill et Fadok, 2000). Une fois le processus inflammatoire ayant rempli sa fonction (rétablissement de l'intégrité vasculaire et élimination du/des pathogènes), le macrophage va entrer dans une phase de contrôle de l'inflammation. Lors de cette phase, il va inverser la qualité des médiateurs solubles qu'il produit afin de libérer des médiateurs anti-inflammatoires tels que le TGF- β , l'IL-10, l'IL-13, l'IL-4 ou encore la prostaglandine E2 et prendre ainsi un phénotype anti-inflammatoire M2 (Parihar *et al.*, 2010).

De manière générale, l'activation du monocyte et son induction vers un profil pro- ou anti-inflammatoire active des signaux de survie nécessaires à la fonction et à l'intégrité du monocyte. Cette acquisition de signaux de survie est essentielle afin de maintenir la viabilité de la cellule dans le microenvironnement de la réponse immune ou de la réponse inflammatoire. En effet, ce microenvironnement est le siège d'une concentration importante de médiateurs inflammatoires cytotoxiques.

III- Monocyte/macrophage et apoptose

La mort cellulaire programmée ou apoptose est un mécanisme essentiel au développement et à la défense contre les pathogènes, conservé à travers l'évolution. L'apoptose se caractérise par d'importants changements morphologiques et biochimiques au sein de la cellule. Ces changements comprennent, la fragmentation du noyau, des perturbations dans l'intégrité du cytosquelette cellulaire, et le bourgeonnement de la cellule conduisant à la fragmentation en corps apoptotique qui seront à leur tour phagocytés par d'autres macrophages (Savill et Fadok, 2000).

La durée de vie des monocytes est déterminée par l'intégration de nombreux signaux de survie ou de mort au sein d'un réseau complexe de signalisation intracellulaire (Doseff, 2004). Chez le monocyte un programme de mort cellulaire est activé de manière constitutive et est à la base de la durée de vie limitée de cette cellule. Lors de l'inflammation ou en présence de facteurs de différenciation, le programme d'apoptose est bloqué ce qui permet de prolonger la survie des monocytes. De façon intéressante, après résolution de l'inflammation, le programme de survie du monocyte est stoppé, et celui-ci reprend un cycle apoptotique classique. Cependant, une fois différencié en macrophage, ce dernier acquiert la capacité d'inhiber, non plus transitoirement mais de manière prolongée, son programme apoptotique, lui promulguant une très longue durée de vie (Parihar *et al.*, 2010).

1- Les mécanismes de l'apoptose

L'apoptose peut être induit par 2 voies principales, la voie extrinsèque médiée par les récepteurs de mort cellulaire, ou la voie intrinsèque, médiée par les mitochondries.

La voie extrinsèque est activée lors du contact entre un ligand et un récepteur de mort cellulaire, appartenant à la famille des récepteurs au TNF, exprimé à la surface de la cellule (Ashkenazi et Dixit, 1998). Chez le monocyte, la voie extrinsèque est modulée par 2 récepteurs majeurs de la famille des récepteurs au TNF, le Fas récepteur (FasR) ou CD95, et les récepteurs TNF-related apoptosis inducing receptors, (TRAILR)1 et TRAILR2. L'activation de ces récepteurs entraîne le recrutement de protéines adaptatrices cytoplasmiques telles que TRADD et FADD (Fas-associated protein with death domain), qui à leur tour vont activer la caspase 8. Il faut cependant noter, que le monocyte ou le macrophage, traité avec une

dose physiologique de $\text{TNF-}\alpha$, va initier une réponse immunitaire, qui, dans le cas du monocyte notamment, va prolonger son espérance de vie. Du point de vue mécanistique, l'apoptose *via* la voie extrinsèque est principalement activée par une trimérisation du FasR qui va recruter du côté cytoplasmique la protéine adaptatrice FADD. Les récepteurs TRAILR1/2 vont quant à eux, après activation, recruter du côté cytoplasmique la protéine adaptatrice TRADD. Ces protéines adaptatrice, FADD et TRADD possèdent un domaine DED (Death Effector Domain), leur permettant d'établir une liaison avec d'autres protéines exprimant ce domaine, et notamment la caspase 8 et la caspase 10 (Krammer, 1999). La caspase 8 peut alors être activée par un clivage auto-protéolytique et, de manière directe ou indirecte, activer la caspase 3, qui à son tour va pouvoir agir de manière directe sur le mécanisme de l'apoptose. La caspase 10, très liée à la caspase 8, peut également être recrutée au sein du complexe DISC, devenir active et initier la voie de signalisation ayant pour finalité l'apoptose (Figure 14).

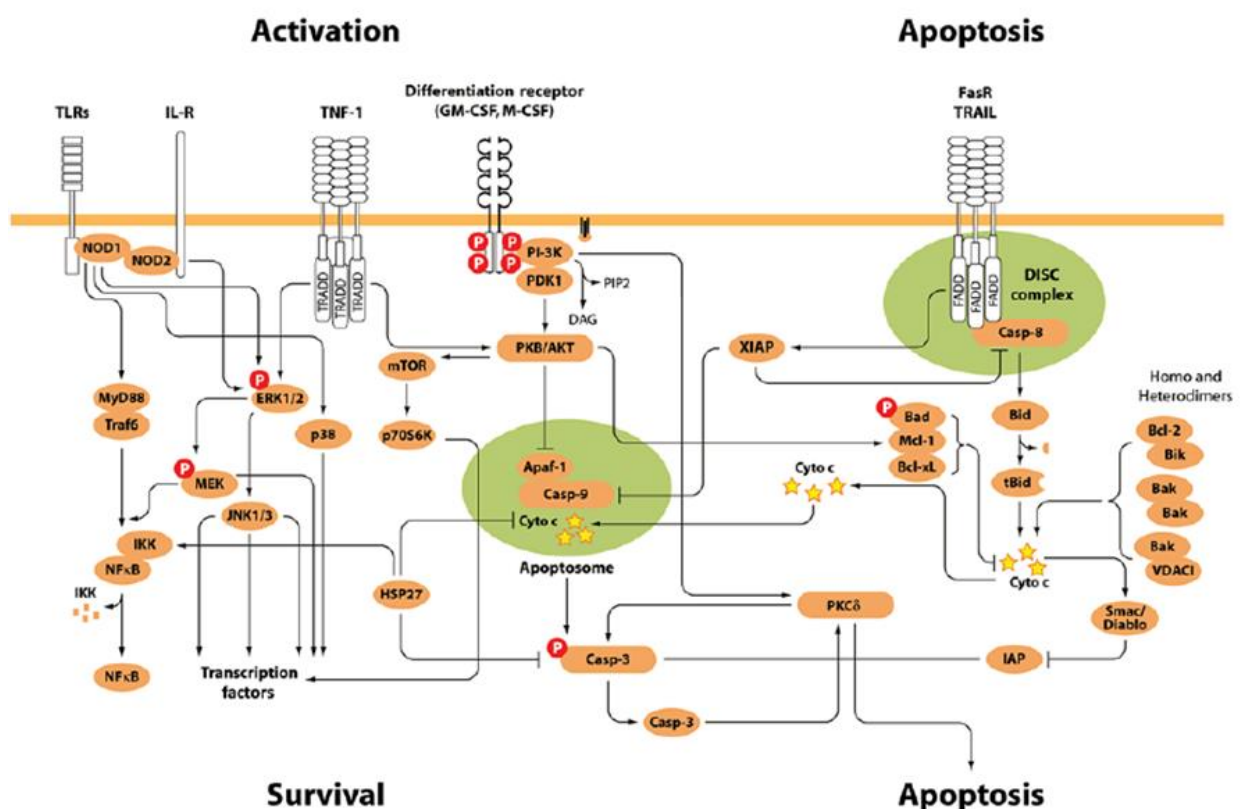


Figure 14 : Mécanismes intracellulaires de la régulation de la longévité des cellules monocytes/macrophages (d'après Parihar *et al.*, 2010).

La deuxième grande voie de l'induction de l'apoptose est la voie intrinsèque et dépendante des mitochondries. Dans cette voie, les stimuli apoptotiques, qui incluent des

signaux de stress et des dommages induits à l'ADN vont entraîner des changements de la perméabilité membranaire mitochondriale, permettant l'activation de la caspase 9. En effet, dans des conditions de stress, la perméabilisation de la membrane de la mitochondrie va permettre la libération de Smac/Diablo et du cytochrome C. Le cytochrome C, en présence d'ATP va pouvoir interagir et former un complexe avec la protéine Apaf-1 (apoptotic protease activating factor 1) et la caspase 9. Ce complexe est également appelé apoptosome (Doseff, 2004). La formation de l'apoptosome va permettre l'activation de la caspase 9, suivi du clivage et de l'activation de la caspase 3. Le complexe Smac/diablo va interagir avec la protéine XIAP, inhibiteur de la caspase 3, et va ainsi lever l'inhibition de la caspase. D'autres molécules interviennent également dans la régulation de la perméabilisation de la membrane mitochondriale, et notamment les protéines de la famille Bcl-2 (B cell lymphoma 2). Tous ces signaux permettent la mise en place d'une balance pro/anti-apoptotique qui contribue à déterminer la longévité de la cellule (Figure 14).

1-a Régulation de la mort cellulaire chez le monocyte

La durée de vie du monocyte/macrophage dépend donc de l'équilibre et de l'orientation de la balance que constituent les signaux pro-apoptotiques et les signaux anti-apoptotiques. Les protéines anti-apoptotiques, agissent en inhibant les caspases ou en empêchant l'activation du programme apoptotique. Parmi ces inhibiteurs du programme apoptotique, on retrouve les protéines de la voie de signalisation Pi3k/Akt, TNF, ERK, Fas, les protéines de choc thermique (Hsp) et d'autres molécules anti-apoptotiques. Ces protéines jouent un rôle déterminant dans la régulation de l'espérance de vie cellulaire en régulant la transcription de gènes ou en bloquant la mise en place du mécanisme d'apoptose.

Ainsi, la voie de signalisation Pi3K/Akt et les protéines Pi3K ont un rôle important dans la survie cellulaire *via* la production de phosphatidylinositol 3 phosphates (PIP3). En effet, le PIP3, est un métabolite impliqué dans une multitude de mécanismes cellulaires, incluant la différenciation, l'apoptose, l'organisation du cytosquelette, la phagocytose et d'autres encore. Les protéines Pi3K permettent également l'activation d'Akt, une serine/thréonine kinase possédant 3 isoformes, Akt1, Akt2, Akt3 qui contiennent chacun un domaine "plekstrin homology" ou domaine PH nécessaire pour la liaison à la membrane cellulaire. Lors de sa translocation à la membrane cellulaire Akt va être phosphorylée par

PDK1 et PDK2, entraînant la suppression de l'apoptose. En effet la phosphorylation de la caspase-9 par Akt inhibe la voie intrinsèque de l'apoptose, impliquant les mitochondries, en bloquant l'activation de la caspase-3 (Cardone *et al.*, 1998). Plus précisément, la voie de signalisation Pi3K/Akt va agir sur l'expression du gène anti-apoptotique Bcl-2 *via* la modulation de l'activité du facteur de transcription NF- κ B et par la phosphorylation d'autres protéines anti-apoptotique et notamment Bad et XIAP. Ainsi, en présence de facteurs de survie adéquats et de signaux pro-inflammatoires (LPS, IL1- β), l'activation de la voie Pi3K/Akt prolonge la survie des monocytes et induit leur différenciation en macrophages (Kelley *et al.*, 1999). Cette place essentielle qu'occupe Akt, et ce contrôle sur la coordination de la signalisation participe au maintien de l'intégrité de la membrane mitochondriale et empêche la libération du cytochrome C ainsi que celle d'autres médiateurs pro-apoptotiques. La préservation des mitochondries maintient la production d'ATP et donc un métabolisme cellulaire normal, ce qui permet à la cellule d'échapper à des mécanismes de morts alternatifs comme la nécrose ou l'autophagie.

PARTIE III :

La voie de signalisation Notch

I- Définition et fonctions de la voie de signalisation Notch

La voie de signalisation Notch a été mise au jour pour la première fois il y a un siècle chez la *Drosophile* par l'observation de la perte partielle de la fonction du gène *Notch* associée à la présence d'entailles ("Notches") au niveau de la marge des ailes (Morgan, 1917) (Figure 15).

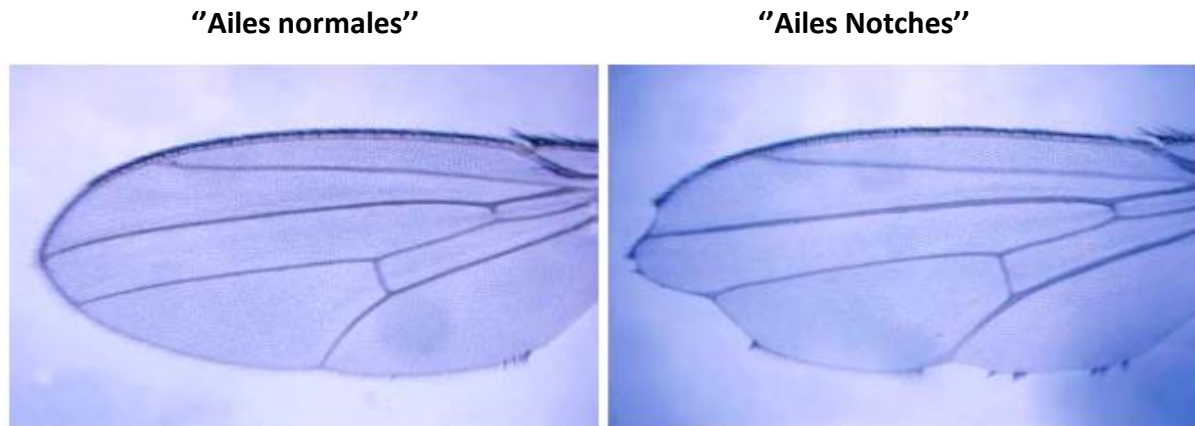


Figure 15: Impact de l'expression du gène *Notch* chez la *Drosophile*. Lames d'ailes de *Drosophila melanogaster* sauvage (à gauche) et d'un mutant avec perte partielle du gène *Notch* (à droite). Les encoches ("Notches") visibles sur l'aile du mutant sont absentes chez la drosophile sauvage (d'après Radtke and Raj, 2003).

La voie Notch constitue un mécanisme de communication cellule à cellule conservé au cours de l'évolution, permettant le dialogue moléculaire entre deux cellules voisines. Depuis sa découverte, cette voie de signalisation n'a cessé d'être étudiée et de démontrer son importance dans la biologie des mammifères. Ainsi, selon le contexte, la voie de signalisation Notch peut promouvoir ou inhiber la prolifération cellulaire, la mort cellulaire, la différenciation... (Li et Harris, 2009). Et parce que cette voie de signalisation participe de manière critique à différents processus fondamentaux au sein d'un large spectre de tissus, elle constitue une voie dont le déséquilibre, par la perte ou le gain de signalisation, participe à un grand nombre de pathologies. En effet, différentes études ont pu mettre en évidence la contribution de la voie Notch dans la pathogénèse de maladies cardiovasculaires (Li *et al.*, 2013), de pathologies inflammatoires et également dans des maladies auto-immunes telle que la sclérose en plaques ou encore le diabète de type 1 (Bassil *et al.*, 2013; Bernsmeier *et al.*, 2016).

A ce jour, parmi les cellules de l'immunité, de nombreuses études ont établi le rôle et l'impact de la signalisation Notch dans la population lymphocytaire T. En effet, la voie Notch

joue un rôle essentiel dans les premières étapes du développement des LT au cœur du thymus mais régule également d'autres types cellulaires tels que les LB et les cellules dendritiques (Radtke *et al.*, 2013). De plus, des études récentes ont montré le rôle de la voie Notch dans la réponse immunitaire induite par les antigènes en périphérie (Amsen *et al.*, 2015; Osborne et Minter, 2007).

L'implication de la régulation de la voie Notch dans ces différents mécanismes met donc en lumière l'importance que peut jouer cette voie dans le rejet de greffe en transplantation (Wood *et al.*, 2015 ; Zhang *et al.*, 2011).

1- Structure et mécanismes d'activations de la voie Notch

1-a Structure des récepteurs et ligands de la voie Notch

Chez les mammifères, il existe 4 récepteurs, Notch1 (Ellisen *et al.*, 1991), Notch2 (Weinmaster *et al.*, 1992), Notch3 (Lardelli *et al.*, 1994) et Notch4 (Uyttendaele *et al.*, 1996), pouvant être liés par 5 ligands différents appartenant à la famille des ligands DSL (Delta and Serrate Ligands) ; le ligand Delta-like ligand 1 (Dll1) (Bettenhausen *et al.*, 1995), Dll3 (Dunwoodie *et al.*, 1997) et Dll4 (Shutter *et al.*, 2000) et les ligands Jagged (Jag1) (Lindsell *et al.*, 1995) et Jag2 (Shawber *et al.*, 1996). Les ligands Jag1, Jag2 ainsi que les ligands Dll1 et Dll4 possèdent une fonction d'agoniste pour les récepteurs Notch alors que le ligand Dll3 joue un rôle d'antagoniste de la voie de signalisation (Kopan et Ilagan, 2009).

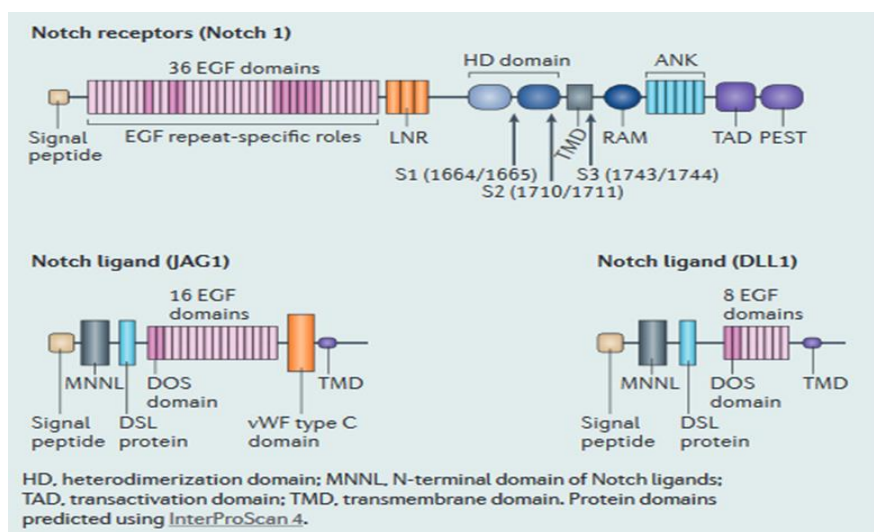


Figure 16 : Structure générale des récepteurs Notch et des ligands JAG et Dll (d'après Andersson et Lendahl, 2014).

Les récepteurs de la voie Notch sont des protéines transmembranaires de type I composées d'un domaine extracellulaire (NECD, Notch Extracellular Domain), d'un fragment transmembranaire (TMD) et d'un domaine intracellulaire (NICD, Notch Intracellular Domain). Le domaine NECD est constitué de répétitions de motifs EGF-like (Epidermal Growth Factor), dont certains sont essentiels pour l'interaction Ligand/Récepteur, de motifs LNR (LIN12/NOTCH repeats) et d'un domaine d'hétérodimérisation juxta-membranaire. Le domaine NICD quant à lui est composé d'un domaine RAM (RBPJ Associated Molecule), de domaine de localisation nucléaire (NLS), permettant la translocation nucléaire de NICD, de domaines ankyrine répétés (ANK) (Lubman et al., 2004), d'un domaine d'activation transcriptionnelle (TAD) et d'une région PEST (Pro-Glu-Ser-Thr) permettant sa dégradation par ubiquitination (Egan *et al.*, 1998) (Figure 16).

1-a-i Importance des domaines EGF-like

La répétition multiple des domaines EGF-like joue un rôle primordial dans la physiologie de la voie de signalisation. Pour exemple, lors de l'interaction d'un récepteur avec son ligand, présenté par une cellule voisine (*trans* activation) qui constitue une activation productive de la voie Notch, les répétitions EGF 11-12 sont essentielles à la réponse en permettant l'interaction Ligand/Récepteur (D'Souza *et al.*, 2010). De même, la répétition 8 est connue pour être responsable de la spécificité au ligand. En revanche lors d'une activation inhibitrice, par l'interaction d'un ligand exprimé à la surface de la même cellule qui présente le récepteur (*cis* inhibition), ce sont les répétitions EGF 24 à 29, également connu sous le nom de région Abuptex, qui sont essentielles (Palmer *et al.*, 2014). De nombreuses répétitions du domaine EGF ont également pour fonction la fixation d'ion calcium, qui joue un rôle important dans la structure du récepteur et dans son affinité pour ses ligands (Cordle *et al.*, 2008 ; Raya *et al.*, 2004).

1-b Structure des ligands de la voie Notch

Egalement décrit en Figure 16 la structure des ligands Notch est constituée d'un domaine MNL (N-terminal domain of Notch Ligand), excepté pour Dll3, suivi d'un domaine DSL (Delta-Serrate-LAG-2), et enfin d'un domaine DOS (Delta and OSM-AA) contenant deux répétitions EGF dites atypiques. Pour les ligands de la famille Jagged, le domaine DSL est suivi de 15 à 16 répétitions EGF, d'un domaine von Willebrand Factor type C et d'un domaine transmembranaire. Pour les ligands de la famille Delta-like, le domaine DSL est suivi de 6 à 8 répétitions EGF et d'un domaine transmembranaire. A ce jour, il existe très peu d'études montrant l'affinité sélective ou la spécificité d'un ligand pour un récepteur Notch, Notch1/Dll4>Dll1 (Andrawes *et al.*, 2013), cet aspect de l'interaction moléculaire Récepteur/Ligand Notch nécessite encore d'être étudié.

1-c Mécanismes d'activations de la voie de Notch

1-c-i activation canonique de la voie Notch

Les récepteurs Notch nouvellement synthétisés sous forme d'un précurseur de 300 kDa, vont subir différents clivages protéolytiques qui vont permettre à la fois la maturation du récepteur lors de son transport à la membrane puis la transmission du signal vers le noyau après contact avec son ligand. Le premier clivage s'effectue dans le Golgi durant le transport du récepteur à la surface. Ce clivage est réalisé par une furin-like convertase (S1), et va entraîner la formation de récepteurs hétérodimériques (NECD/NICD) à la surface de la cellule.

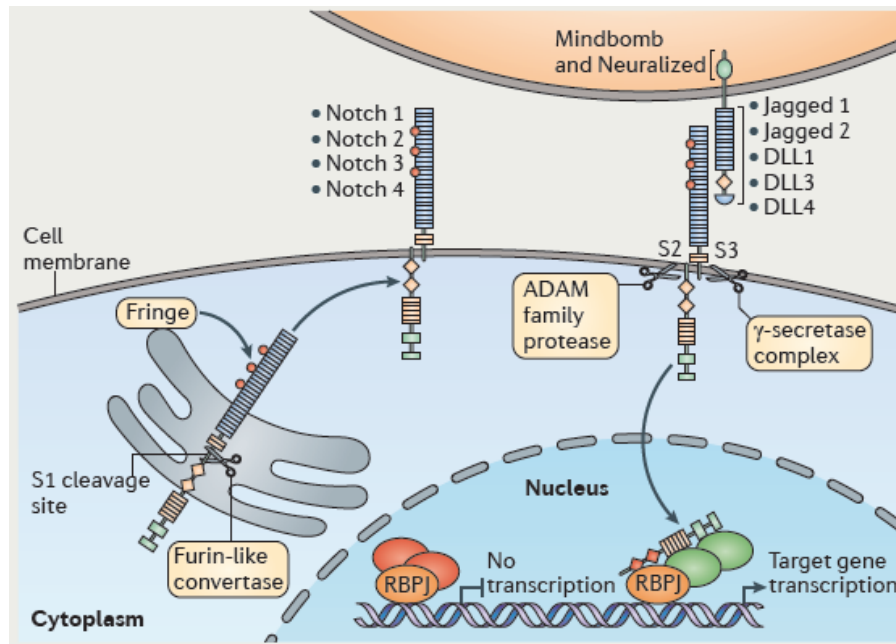


Figure 17 : Mécanismes de maturation et d'activation de la voie de signalisation Notch (d'après Radtke *et al.*, 2013).

Une fois que l'initiation de la signalisation, par le contact du ligand avec son récepteur entre deux cellules voisines a eu lieu, deux nouveaux clivages successifs surviennent. Le premier, réalisé par une enzyme ADAM (A Disintegrin And Metalloproteinase domain-containing protein), de la famille des métalloprotéinases, qui va couper le récepteur Notch au niveau du site de clivage S2, proche de la membrane du côté extracellulaire.

Ce clivage entraîne la libération du fragment extracellulaire du récepteur et la trans-endocytose du NECD par la cellule exprimant le ligand activateur. Ce mécanisme d'endocytose, nécessite une mono-ubiquitynation de la queue cytoplasmique du ligand par une E3 ubiquitine ligase de la famille Mindbomb ou Neutralized. Après ce second clivage, et la libération du NECD, un troisième et dernier mécanisme de protéolyse survient. Ce dernier clivage, par le complexe γ -secrétase (Wolfe et Kopan, 2004), composé de protéines prénilines (PSEN1 et PSEN2), nicastrine (PEN2) et de la protéine APH1, va couper le domaine transmembranaire du récepteur Notch entraînant la libération du domaine NICD (S3)(Sorensen et Conner, 2010). Suite à ce clivage, le fragment NICD va franchir la membrane nucléaire et entrer dans le noyau où il s'associera à un facteur de transcription CSL (CBF1/Suppressor of Hairless/LAG-1 également connu en tant que RBPJ (Recombination signal Binding Protein for immunoglobulin κ J region)). Le fragment NICD va également

recruter des molécules co-activatrices supplémentaires telles que des protéines de la famille mastermind (MAML1-3)(Wilson et Kovall, 2006) ou encore la molécule p300. Ainsi, le complexe protéique nouvellement formé sera apte à induire la transcription de gènes cibles de l'activation de la voie Notch. Les gènes cibles de la voie Notch les mieux caractérisés sont les gènes de la famille HES (Hairy Enhancer of split ; *HES1* et *HES5*) et de la famille HRT (Hairy Related Transcription factor ; *HEY1*) (Brzozowa *et al.*, 2013). Ces derniers jouent alors le rôle d'effecteurs de la voie Notch en modulant les fonctions de la cellule.

1-c-ii activation non-canonique de la voie Notch

La voie de signalisation Notch peut être activée de deux manières : par la voie canonique, médiée par l'interaction d'un ligand Notch avec son récepteur, qui induit la signalisation intracellulaire et la transcription de gènes cible dépendante de CSL et NICD, que nous venons d'aborder, et par la voie non-canonique, qui utilise un mécanisme différent. L'activation non-canonique de Notch ne nécessite pas l'intervention de CSL (Jin *et al.*, 2013) et est indépendante de l'activation par l'un des 5 ligands Notch mais peut être activée par d'autres ligands caractérisés comme non-canonique (Andersen *et al.*, 2012). Cette famille de ligands, comprenant entre autres Dlk-1 (Delta like 1), DNER (Delta/Notch-like-EGF-related receptor) et Jedi (Jagged and Delta protein) (D'Souza *et al.*, 2008), présente une très forte diversité structurale (protéines membranaires ou sécrétées). Du point de vue mécanistique, l'activation non-canonique de la voie Notch est peu documentée et peu connue. Le rôle de ce mécanisme d'activation a été principalement mis en évidence dans les cellules souches ou cellules progénitrices mais également dans les cellules embryonnaires. L'activation non-canonique de la voie Notch pourrait donc jouer un rôle important dans les cellules précoces et non-différenciées lors du développement et interagir avec des régulateurs intracellulaires conservés au cours du développement (Andersen *et al.*, 2012). Ainsi, le principal partenaire associé à l'activation non-canonique de Notch est la voie Wnt/ β -caténine. En effet, plusieurs études chez la Drosophile ont permis de mettre au jour des interactions, synergiques ou antagonistes (Lawrence *et al.*, 2001) entre ces deux voies de signalisation de façon contexte-dépendant. Bien que peu décrite chez l'Homme, cette activation particulière de la voie de signalisation Notch pourrait être biologiquement importante et doit être considérée. En effet, elle est susceptible d'interférer lors de l'utilisation d'une stratégie d'inhibition de la

transcription des gènes induite par CSL ou le complexe CSL/NICD rendant cette stratégie inutile dans le cas où la signalisation induite requiert la voie d'activation non-canonique.

2-Mécanismes de contrôles de la voie de signalisation Notch

De par l'existence de 4 récepteurs Notch et de 5 ligands DSL, les fonctions de la voie de signalisation Notch dans des conditions physiologiques et physiopathologiques, sans compter l'impact de l'activation non-canonique de la voie Notch, encore mal définie, sont complexes et très dépendantes du contexte pathologique et cellulaire (Kopan et Ilagan, 2009).

Cependant, à la vue des mécanismes essentiels que contrôle cette voie de signalisation, il est important que des mécanismes de régulation existent. De ce fait, bien que la voie Notch soit conservée à travers l'Evolution, différents mécanismes de contrôle, nécessaires pour réguler la puissance des signaux délivrés ont également été conservés. Différents mécanismes permettent de réguler l'activité de la voie Notch tels que le contrôle de la localisation de l'expression ligands/récepteurs à travers l'organisme, ou le contrôle intracellulaire de l'expression des effecteurs de la voie, qui dépend de la mise en place de différents mécanismes sous-jacents.

Le premier mécanisme de régulation de l'activité de la voie de signalisation Notch est un contrôle dit spatial. En effet, les récepteurs Notch sont exprimés de façons ubiquitaires, au contraire des ligands de la voie Notch, exprimés de manière très contrôlée au sein de niches anatomiques définies (Chung *et al.*, 2016). Cette hétérogénéité de l'expression ligands/récepteurs assure à la voie de signalisation un contrôle très fin de l'émission/réception des signaux. Par exemple, les cellules épithéliales thymiques expriment fortement le ligand Dll4 sous contrôle du gène *Foxn 1* exprimé par les cellules épithéliales du thymus (voir Figure 16). De cette façon il y a constitution d'une niche, à l'intérieur du thymus, dans laquelle la signalisation Notch délivrée aux cellules progénitrices T *via* le ligand Dll4 est très importante (Calderón et Boehm, 2012).

Le second mécanisme de contrôle, intracellulaire, fait appel à différents mécanismes de régulation de l'expression des ligands et récepteurs Notch. Pour exemple, la glycosylation des récepteurs et ligands Notch sur un domaine EGF spécifique peut moduler les propriétés

d'interaction Ligand/Récepteur (Okajima *et al.*, 2008). De même, la présence de résidus lysine dans le domaine NICD représente des sites potentiels d'ubiquitination du récepteur ou par des ubiquitines E3 ligases telles que Neuralized et Mindbomb. Ce mécanisme est également présent pour les ligands de la voie Notch. L'ubiquitination du Ligand/Récepteur entraîne l'endocytose de ce dernier et permet donc de réguler son expression à la surface de la cellule (Chitnis, 2006; Le Borgne, 2006). De même, la protéolyse des ligands et récepteurs Notch par les metalloprotéinases de la famille ADAM représente un mécanisme de régulation de l'expression à la surface de la cellule (Zolkiewska, 2008).

3- Le Delta like ligand 4

3-a Dll4 et angiogénèse

Parmi les cinq ligands de la famille Notch, le ligand Dll4. Ce ligand a été identifié pour la première fois par Shutter (Shutter *et al.*, 2000) et caractérisé comme possédant une expression très sélective dans l'endothélium vasculaire, donc participant de façon spécifique dans la biologie de la CE. Dll4 a notamment été beaucoup décrit dans le domaine de la cancérologie et son rôle important lors l'angiogénèse tumorale (Noguera-Troise *et al.*, 2006). En effet, durant la pousse du vaisseau sanguin, la voie de signalisation Notch contrôle l'équilibre entre les CE de la tige et les CE de la pointe. Ces dernières, qui représentent le front de pousse du vaisseau conduisent et orientent sa croissance. Les cellules de la pointe sont induites et guidées dans leur avancée par un gradient de VEGF (Suchting *et al.*, 2007). Si la stimulation des récepteurs au VEGF (VEGFR) est bloquée, alors les filopodes de la cellule se rétractent et la progression vasculaire est stoppée. Durant la croissance vasculaire, l'expression de VEGF entraîne l'augmentation de l'expression de Dll4 dans la CE de la pointe qui à son tour entraîne la diminution de l'expression du VEGFR dans les cellules voisines (Jakobsson *et al.*, 2010). Ainsi, la cellule exprimant Dll4 devient la cellule de pointe, et la répétition de ce mécanisme entraîne la croissance du vaisseau.

De façon intéressante et paradoxale, la réduction de la tumeur par l'inhibition de la signalisation Dll4/Notch est associée à une augmentation de la vascularisation par l'augmentation du nombre de vaisseaux, de branches vasculaires et d'interconnexions entre

ces branches (Thurston *et al.*, 2007). Ainsi, cette néovascularisation de la tumeur induite par l'inhibition de DLL4 semble non-fonctionnelle (Figure 18).

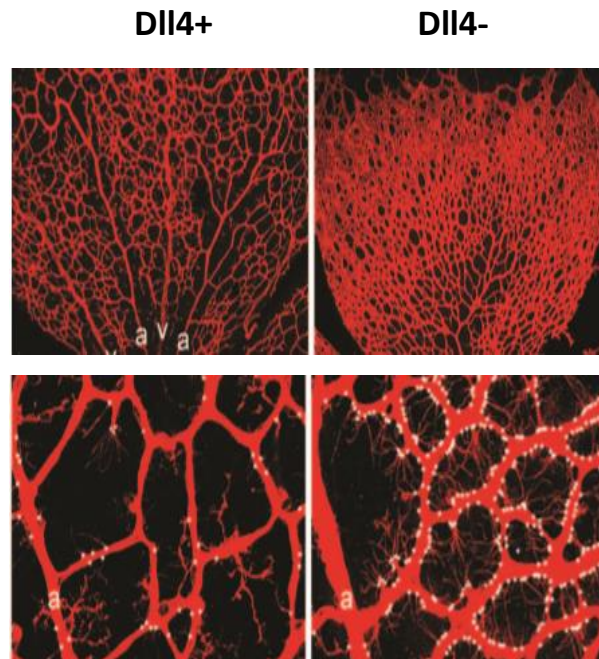


Figure 18 : Impact de l'expression de DLL4 sur l'angiogenèse : formations de structures vasculaires non fonctionnelles (D'après Suchting *et al.*, 2007).

Le ligand DLL4 constitue donc, en cancérologie, une cible primordiale afin de ralentir la croissance tumorale en inhibant la pousse des vaisseaux qui permettent l'irrigation de la tumeur (Andersson et Lendahl, 2014). C'est pourquoi différents groupes se sont attachés au développement d'inhibiteurs de l'activation DLL4 dépendante de la voie Notch (Ridgway *et al.*, 2006). Testés sur différentes lignées cellulaires tumorales humaines et murines poussant de façon sous-cutanée chez des souris cobayes, ces inhibiteurs ont montré une efficacité de réduction de la croissance de la tumeur de 50% à 90% selon la nature du modèle tumorale (Scehnet *et al.*, 2007). Pour exemple, le MEDI0639 (Jenkins *et al.*, 2012) ou encore le demcizumab testés sur différents types de cancer tels que le cancer ovarien, pancréatique, colorectal... (Andersson et Lendahl, 2014).

3-b Rôle de Dll4 dans le thymus et la réponse immunitaire T

Le thymus, qui permet la génération des LT, cruciaux lors de la réponse immunitaire, est fortement dépendant de la signalisation Notch médié par Dll4. Il est continuellement colonisé par des progéniteurs dérivés de cellules souches hématopoïétiques de la moelle osseuse. Il est important de noter que le ligand Dll4 joue également un rôle important dans la moelle osseuse en favorisant le renouvellement des cellules progénitrices hématopoïétiques (Catelain *et al.*, 2014). Ces progéniteurs migrent *via* la circulation sanguine jusqu'au thymus où ils deviennent des progéniteurs thymiques précoces (ETP) et s'orienteront en cellules T, proliféreront, et enfin, se différencieront en lymphocytes T mature et fonctionnel. Ce processus de différenciation, qui comporte différentes étapes porte le nom de lymphopoïèse T. Durant la première étape de ce développement, les cellules thymiques portent le nom de cellules double négatives (DN) car elles n'expriment à leurs surfaces ni la molécule CD4 ni la molécule CD8. Puis, ces cellules DN vont augmenter leur expression de surface à la fois de CD4 et de CD8 devenant de cette manière des cellules T double positives (DP) avant de subir des étapes de sélection positive et négative qui leurs permettront de devenir des LT matures simple positives (SP) CD4 ou CD8. Ces cellules SP migreront alors en périphérie en attendant leur activation par la reconnaissance de leur antigène (Radtke *et al.*, 2013).

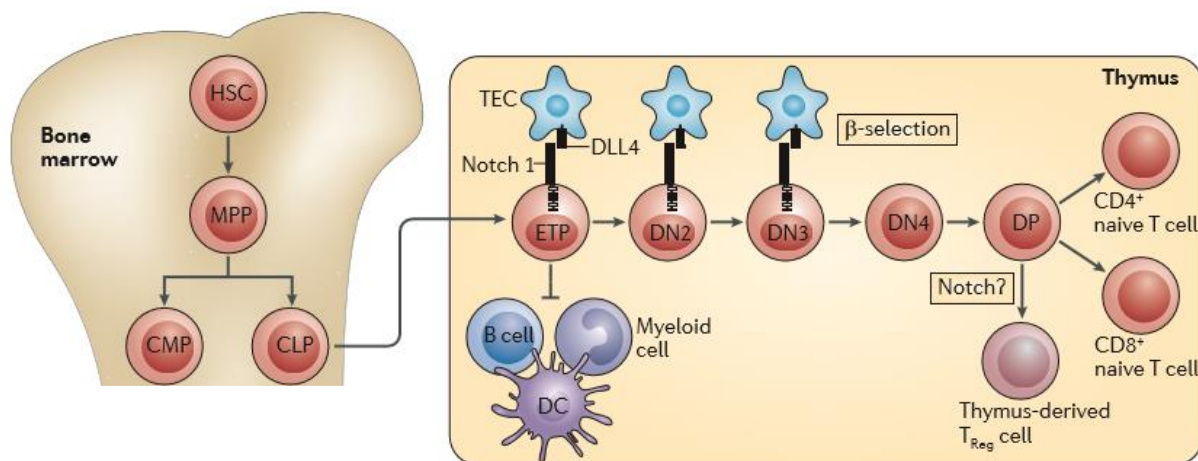


Figure 19 : Implication de la voie de signalisation Notch au cours des étapes précoces de la lymphopoïèse T (d'après Radtke *et al.*, 2013).

Ainsi, le rôle de la voie de signalisation Notch au cours de la lymphopoïèse a été beaucoup étudiée et notamment l'importance de l'interaction du récepteur Notch1 avec le

ligand Dll4, indispensable au développement et à la maturation du LT (Koch *et al.*, 2008). Le récepteur Notch1, exprimé à la surface des cellules Lymphoïdes progénitrices (CLP) qui vont coloniser le thymus, va interagir avec le ligand DLL4 exprimé par les cellules épithéliales thymiques (TEC)(Mohtashami et Zúñiga-Pflücker, 2006).

Cette interaction du ligand Dll4 et du récepteur Notch1 est nécessaire aux étapes de différenciation du progéniteur T jusqu'au stade DN3 (Figure 18). L'activation de la voie de signalisation Notch durant ces phases précoces du développement des LT inhibe le développement d'autres lignées telles que les LB et les cellules myéloïdes dont les cellules dendritiques (Figure 19). Immédiatement après la β -sélection, menant le thymocyte de la phase DN3 à DN4, la voie de signalisation Notch est down régulé par la signalisation induite par le pré-TCR (Yashiro-Ohtani *et al.*, 2009). La délétion conditionnelle de Dll4 dans le thymus a montré que le ligand est essentiel à l'activation Notch et à lymphopoïèse T (Hozumi *et al.*, 2008). Dans leur étude sur l'impact de la signalisation Notch dans le thymus, Mohtashami *et al.*, montrent que le ligand Dll4 possède une forte avidité dans la liaison avec les thymocytes doubles négatifs en comparaison du ligand Dll1 et que cette interaction est médiée par le récepteur Notch1. La forte avidité de liaison de Dll4 pour les thymocytes DN et sa capacité de trans-endocytose du NECD associé à une forte activation de la voie Notch mettent en évidence l'implication cruciale de Dll4 dans le développement des LT (Mohtashami *et al.*, 2010).

Au-delà de l'importance de la signalisation Notch médiée par Dll4 lors des phases précoces du développement des LT, le ligand semble également impliqué dans la différenciation des cellules Th1 (Amsen *et al.*, 2009). En effet, il a été montré une corrélation entre l'induction de la différenciation des Th1 par les cellules présentatrices d'antigènes (APC) et l'expression des protéines Dll par ces mêmes cellules. La combinaison des ligands activateurs des TLR montre une augmentation de l'expression du ligand Dll4 par les DC en parallèle de l'augmentation de leur capacité à induire la différenciation en cellule Th1 (Napolitani *et al.*, 2005). Encore une fois ce mécanisme est dépendant de l'interaction Notch1/Dll4. Comme a pu le montrer Minter l'expression intracellulaire de N1ICD dans les cellules TCD4+ résulte en une orientation vers un profil Th1 (Minter *et al.*, 2005).

Le ligand Dll4, plus que de jouer un rôle primordial dans la biologie de la CE joue également un rôle déterminant dans la biologie du Lymphocyte T et dans l'orientation de la

réponse immunitaire vers une réponse pro-inflammatoire par l'induction de la différenciation des LTCD4⁺ en cellules Th1 (Radtke *et al.*, 2013).

3-c Dll4 et macrophage.

En 2007, 7 ans après la découverte du ligand Notch DLL4 par Shutter, Fung mis en évidence l'augmentation de l'expression de Dll4 dans les macrophages en réponse à des stimuli pro-inflammatoires tels que le LPS ou l'IL-1 β de façon TLR4 et NF- κ B dépendante (Fung *et al.*, 2007). Dans cette étude, Fung montre également que la co-incubation de macrophages avec des cellules exprimant Dll4 induit l'expression de gènes associés au phénotype de macrophages pro-inflammatoire M1 tels que l'IL-1 β , iNOS, ainsi que les voies de signalisation MAPK, Akt et NF- κ B. De façon intéressante, la liaison du ligand Dll4 sur son récepteur, présenté par le macrophage, induit une augmentation de Dll4 à la surface de la cellule (Fung *et al.*, 2007). De même, il a fait le lien entre présence de macrophages exprimant Dll4 et plaques athérosclérotiques et implique ainsi le ligand Notch dans les mécanismes inflammatoire et pathologiques de l'athérosclérose. Plus tard, la même équipe montrera *in vivo* l'évidence que l'activation de la voie Notch par Dll4 contribue à la pathogenèse du syndrome cardiométabolique (Fukuda *et al.*, 2012). Ils en déduisent également que la polarisation excessive des macrophages vers ce statut pro-inflammatoire induite par la voie Notch peut contribuer à la pathogenèse du syndrome cardiométabolique. Enfin, ils démontrent *in vitro* que le blocage de la signalisation induite par Dll4 et médié par Notch inhibe le développement de l'athérosclérose et de la résistance à l'insuline *in vivo* mettant en avant le rôle primordial de Dll4 dans cette pathologie (Fukuda *et al.*, 2012).

L'expression de Dll4 par les macrophages M1 a également été liée à la maladie de Crohn. En effet l'expression de Dll4 par les M1 entraîne une augmentation de l'expression de HES1 dans les cellules épithéliales intestinales. De plus une corrélation entre concentration en macrophages M1 et expression de HES1 a été confirmée dans la muqueuse de patients Crohn (Ortiz-Masiá *et al.*, 2016). Autre évidence de l'implication de Dll4 dans les pathologies associées aux macrophages, son rôle dans les lésions vasculaires lors de greffes de veines. Koga *et al.*, met en lumière l'implication de Dll4 dans la régulation de molécules pro-inflammatoires chez le macrophage et la participation à l'interaction macrophages/cellules musculaires lisses, induisant leur prolifération, leur migration et empêche leur

différenciation. Cet effet est inhibé par l'induction de la perte de fonction de Dll4 dans le macrophage et met en avant l'axe Notch-Dll4 comme nouvelle cible thérapeutique de cette pathologie (Koga *et al.*, 2015).

Ainsi, Dll4 est décrit comme étant un médiateur inflammatoire important du macrophage et permet, tout comme chez le lymphocyte et la CE, d'orienter la réponse de la cellule vers un statut pro-inflammatoire M1 intervenant dans différentes pathologies inflammatoires tels que l'athérosclérose, le syndrome cardiométabolique ou la maladie de Crohn.

II- La voie Notch en transplantation

Récemment, plusieurs groupes ont utilisés des stratégies de gain et perte de fonction de gène de la voie Notch afin d'étudier *in vivo* l'implication de la voie de signalisation dans un contexte de rejet de greffe ou de la GVHD (Riella *et al.*, 2011 ; Wood *et al.*, 2015). Toutes ces études, s'attachent principalement sur la fonction des LT et ont pu mettre en évidence que la voie Notch est une voie pro-inflammatoire majeure dans l'allo-immunité induite par les LT et que l'inhibition de cette voie Notch peut tempérer à la fois le rejet allogénique et la GVHD. Ces différentes études identifient l'inhibition de la voie Notch comme une stratégie thérapeutique envisageable en transplantation. Effectivement, Riella, *via* l'utilisation d'anticorps monoclonaux dirigés contre le ligand Notch Dll1 dans un modèle de transplantation d'allogreffe cardiaque a pu observer que l'inhibition de Dll1 retarde l'apparition du rejet de l'allogreffe lorsque cette stratégie est utilisée en complément d'un blocage de la co-stimulation CD28 (Riella *et al.*, 2011). Cette protection contre le rejet a été associée à une diminution de la production d'IFN- γ , d'IL-2 et d'IL-17 par les LT dits spécifique du donneur, en parallèle une augmentation de cytokines caractéristique de la réponse Th2 est observé telles que l'IL-4 et l'IL-5. Dans la même étude, ils démontrent que l'effet protecteur de l'inhibition de Dll1 est perdu chez un receveur STAT6 déficient ou en complément d'une inhibition de la signalisation IL-4. Ce travail met donc en lumière l'importance à la fois de la voie de signalisation Notch au cours des mécanismes inflammatoires du rejet mais également de la production d'IL-4 afin de retarder le rejet de greffe. Ce papier a été le premier à démontrer l'effet pathogène de la voie de signalisation Notch *in vivo* et dans le même temps l'effet thérapeutique bénéfique potentiel d'une stratégie d'inhibition de cette même voie (Wood *et al.*, 2015).

Contexte et Objectifs du Projet de thèse

I- Contexte de l'étude : Notch et endothelium en Transplantation

Depuis plusieurs années déjà, notre équipe, dirigée par le Dr Charreau au sein de l'UMR INSERM 1064, étudie les mécanismes cellulaires impliqués dans les fonctions et dysfonctions de la cellule endothéliale en particulier dans un contexte de transplantation d'organes (cœur, rein). La finalité de ces travaux est le développement de nouvelles stratégies de prévention des dysfonctions endothéliales, de l'inflammation vasculaire et *in fine* de protection du greffon. En effet, l'activation et la dysfonction endothéliale jouent un rôle essentiel dans la mise en place des processus inflammatoires participant au rejet d'allogreffe. Dans un premier temps, le changement de statut et de phénotype de la CE permet le recrutement et l'infiltration des leucocytes dans le greffon conduisant aux mécanismes de rejet aigu. Dans le cas d'une activation endothéliale chronique les épisodes répétés de destruction de l'endothélium résultants de mécanismes incluant la lyse des CE dépendante du complément et/ou des anticorps (ADCC) et l'apoptose sont suivis de phases de « réparation » qui mettent en œuvre la prolifération et la migration. L'ensemble de ces mécanismes vont à la fois initier et favoriser le développement des lésions vasculaires qui participent à l'artériosclérose et à la vasculopathie du greffon qui aboutissent à la thrombose et à la perte du greffon.

Dans ce contexte, les précédents travaux menés au sein de l'équipe ont permis de mettre en évidence l'importance et l'implication de la voie de signalisation Notch dans la physiologie de la cellule endothéliale et dans les dysfonctions associées (pour revue Quillard et Charreau, 2013). Ainsi l'analyse de l'expression et de la régulation des récepteurs Notch dans la cellule endothéliale au cours de l'inflammation induite *in vitro* par le TNF- α a permis de montrer une diminution de l'activité basale de la voie Notch dans les CE quiescentes. Cette perte globale d'activité Notch coïncide avec une modification de l'expression des récepteurs Notch. Ainsi le TNF- α entraîne de façon simultanée une diminution de l'expression du récepteur Notch4 en parallèle d'une surexpression du récepteur Notch2 *via* la mobilisation des voies de signalisation NF- κ B et Pi3K respectivement (Quillard *et al.*,

2010). Ce travail montrait l'intrication de la voie Notch et des voies de signalisation de l'inflammation. Ce concept émergent a depuis été aussi rapporté par d'autres équipes.

L'impact fonctionnel de la diminution de l'expression de Notch4 a également été analysé au cours de la vasculopathie d'allogreffe dans un modèle de transplantation cardiaque chez le rat. Ce travail a pu mettre en évidence la forte diminution de l'expression endothéliale de Notch4 dans les greffons présentant une artériosclérose. Parallèlement, le blocage *in vitro* de l'expression de Notch4 dans la CE a été étudié au moyen de siRNA dans des cellules endothéliales (Quillard et al., 2008). Ces expériences ont montré que la perte d'expression de Notch4 a un impact fonctionnel sur 3 mécanismes : l'activation, l'apoptose et la migration des cellules endothéliales. En effet diminuer Notch4 favorise l'activation endothéliale par le TNF- α , induit l'apoptose de la CE et inhibe la migration et la cicatrisation endothéliale. Ces résultats confèrent donc à la voie Notch et à Notch4 en particulier des fonctions régulatrices importantes dans la biologie de la cellule endothéliale. L'ensemble de ces observations *in vitro* et *in vivo* dans un modèle de greffe suggèrent que l'altération de la signalisation Notch induite par l'inflammation et reflétée par la diminution de l'expression du récepteur Notch4 dans les CE de l'allogreffe est un mécanisme associé à l'artériosclérose du greffon (Quillard *et al.*, 2008).

De façon complémentaire, l'impact fonctionnel d'une augmentation de l'expression du récepteur Notch2 dans les CE a aussi été étudié. L'utilisation d'un adénovirus codant pour le domaine NICD du récepteur Notch2 (N2ICD) a montré que l'activation constitutive de la voie Notch *via* N2ICD dans les CE, induit l'apoptose des cellules par une forte répression de gènes anti-apoptotique (survivine, April) et pro-apoptotique (Bim, DAPK2, HRK, DR5 et CD40) (Quillard *et al.*, 2009). Cette étude propose un rôle apoptotique pour la voie Notch activée *via* le récepteur Notch2 et montre que la diminution de la survivine est un mécanisme effecteur de cette apoptose.

Plus récemment, le rôle de la désintégrine et métalloprotéinase ADAM10, impliquée dans le clivage des récepteurs Notch, au cours de l'activation canonique de la voie de signalisation Notch dans les CE a été analysée au moyen de modèles perte et gain de fonction dans des cultures primaires de cellules endothéliales humaines. Nous montrons également que la métalloprotéase ADAM10 est régulée par les CE et les macrophages dans les greffons cardiaques au cours de l'AMR et participe à la production des chimiokines IL-8,

MCP-1 et de VCAM-1 soluble. Ce mécanisme est indépendant de la voie Notch. La surexpression d'ADAM10 active également la voie canonique Notch *via Hes1* et *Hey1*, avec pour conséquences une régulation du ligand Dll4 et la production de l'IL-6 par les CE. Ce travail a permis de mettre en évidence la contribution de l'activité d'ADAM10 à des mécanismes inflammatoires dépendants et indépendants de la voie Notch (Pabois *et al.*, 2014). De plus, une augmentation de la sécrétion d'IL-6 par les CE transduite par un adénovirus codant pour Dll4 a été mis au jour, suggérant l'implication de l'axe Notch/Dll4 dans ce processus et donc dans les mécanismes de l'inflammation.

II- Objectifs du Projet de recherche

Ma thèse s'inscrit donc dans la continuité des travaux menés précédemment sur le rôle de la voie Notch dans l'inflammation. Ainsi, pour faire suite aux travaux décrits ci-dessus, j'ai donc étudié l'implication de la voie de signalisation Notch et du ligand Dll4 lors de l'interaction CE/macrophages au cours du rejet aigu humoral cardiaque. Ce projet a été réalisé dans le cadre d'une collaboration avec le Dr. Claire Toquet et le service d'anatomie pathologique du CHU de Nantes ainsi que le Dr. Sabine Pattier du service de cardiologie et transplantation cardiaque du CHU de Nantes. A travers l'analyse de biopsies endomyocardique de 22 patients transplantés cardiaques, dont 9 présentaient un rejet aigu humoral de grade pAMR2 nous avons pu mettre en évidence la surexpression du ligand Dll4 à la fois dans les cellules endothéliales microvasculaires mais également dans les macrophages intravasculaires. Cette première observation nous a permis de poser l'hypothèse que Dll4 pourrait jouer un rôle dans l'activation endothéliale au cours de l'AMR et dans l'interaction CE/macrophage observée au cours de l'inflammation vasculaire typique de ce rejet. J'ai donc focalisé cette première étude sur la contribution de l'expression endothéliale de Dll4 dans la différenciation des monocytes circulants en macrophages dans un contexte de transplantation. **Ce travail a fait l'objet d'une publication, que je signe en co-premier auteur, présentée dans la partie 1 du chapitre « Résultats ».**

Dans un second temps, et afin d'approfondir les mécanismes d'induction de la polarisation du macrophage observés dans notre première étude, j'ai analysé l'impact de la signalisation Notch induite par le ligand DLL4 au cours de la polarisation des macrophages *in vitro* en macrophages pro-inflammatoires de type M1 et anti-inflammatoires de type M2. En effet, bien que l'expression du ligand DLL4 par les macrophages pro-inflammatoires M1 ait été rapportée dans quelques études (Fukuda *et al.*, 2012 ; Fung *et al.*, 2007) le rôle de la voie Notch et de DLL4 dans polarisation des macrophages en macrophages M2 n'est à ce jour pas connue. Nous avons donc choisi pour cette seconde étude d'étudier l'impact du ligand DLL4 lors de la polarisation du macrophage en macrophage M2. Notre étude met en évidence le rôle majeur du ligand Notch dans la régulation des populations M1/M2 et suggère que DLL4 constitue une barrière de sélection contrôlant la polarisation des macrophages. **Ce travail est présenté dans la partie 2 du chapitre « Résultats » sous la forme d'un article que je signe en premier auteur et qui est en préparation.**

En parallèle du développement de ces deux axes principaux, deux collaborations ont été menées. La première collaboration, avec le Pr Anglicheau et le Dr Delville de l'hôpital Necker, Paris, sur le rejet aigu humoral rénal en absence d'anticorps anti-HLA spécifiques du donneur (DSA). En effet, ces rejets, bien qu'histologiquement caractéristiques de l'AMR, ne sont pas associés à une détection de DSA chez le transplanté. Ces rejets sont induits par des anticorps ne ciblant pas les molécules du HLA, et dont la cible antigénique n'est pas connue. L'objectif de cette collaboration était d'initier une étude visant à identifier la ou les cible(s) cellulaire(s) de ces anticorps dans le sérum des patients en recherchant la réactivité des sérums pour différentes cellules vasculaires rénales. Ce projet avait aussi pour objectif d'aboutir à une classification des sérums des patients en fonction de leur profil de réactivité afin de fournir une aide dans la sélection des sérums pour lesquels une analyse protéomique sera réalisée dans le but d'identifier le(s) antigène(s) reconnu(s). Après la centralisation des sérums de plus de 50 patients de cette étude rétrospective multicentrique, 20 patients sans anticorps anti-HLA ou anti-MICA détectables ont été inclus dans notre l'étude. **Les principaux résultats de cette étude sont montrés dans la partie 3 du chapitre « Résultats ».**

Un second travail collaboratif a été mené avec le laboratoire de phytochimie SONAS de l'Université d'Angers dans le cadre du projet régional « HYPROTEC ». Ce projet a pour objectif d'identifier des nouvelles molécules d'origine naturelle limitant l'activation des cellules endothéliales dans un contexte inflammatoire. La cellule endothéliale a été choisie pour ce projet comme cible cellulaire car elle exprime un panel large de molécules qui participent à l'inflammation (par exemple les molécules d'adhésion) et à l'immunité (molécules du HLA). Un panel de ces molécules a été utilisé comme marqueurs pour notre étude afin de déterminer la possible activité pharmacologique des extraits et molécules naturelles. Ces molécules ont été purifiées, isolées et pour certaines chimiquement modifiées et leurs effets anti-inflammatoires et/ou régulateurs de l'expression de molécules de l'immunité ont été analysés *in vitro* par la technique d'ELISA cellulaire, sur des cultures de cellule endothéliales primaires. **Les résultats de cette étude sont montrés dans la partie 4 du chapitre « Résultats » et font l'objet d'un article soumis.**

Les étapes et objectifs de mon projet de recherche sont schématisés dans la Figure 20.

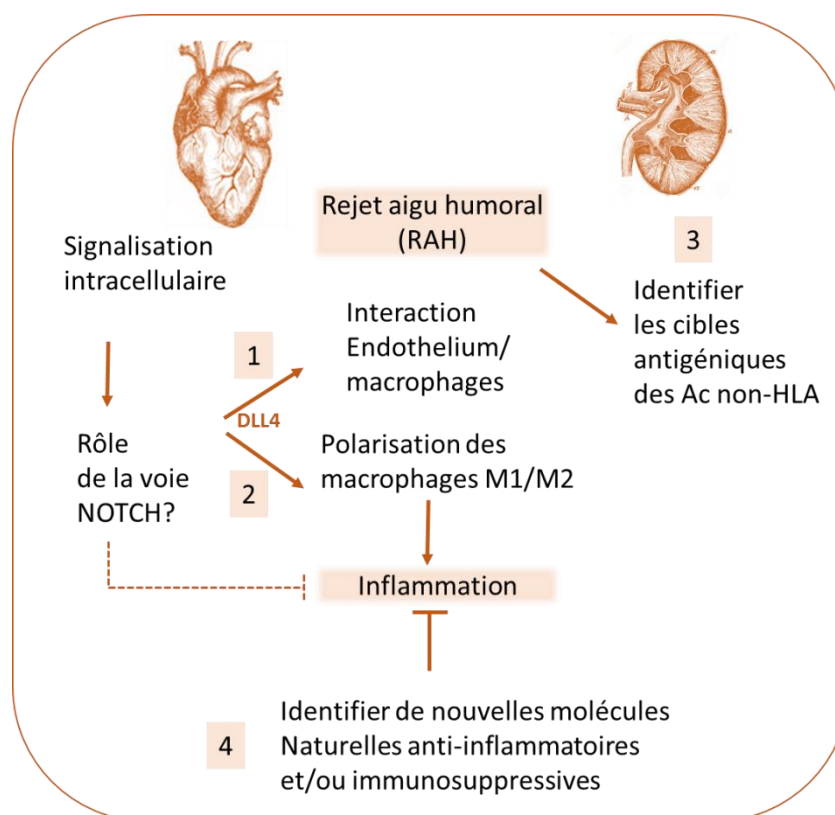


Figure 20. Objectifs et étapes du projet de recherche.

RESULTATS

PARTIE I :

Contribution de l'expression du ligand Notch Dll4 et de l'IL-6 par la cellule endothéliale au cours du rejet aigu humoral

Article I: Notch signaling mediates crosstalk between endothelial cells and macrophages *via* DLL4 and IL-6 in cardiac microvascular inflammation

Sylvain Pagie, Angélique Pabois, Nathalie Gérard, Christian Labois, Sabine Pattier, Toquet, Philippe Hulin, Steven Nedellec, Claire Toquet et Béatrice Charreau.

Article publié dans Biochemical Pharmacology

Objectif :

De précédents travaux menés au sein de l'équipe ont permis de mettre en évidence l'implication des récepteurs Notch2 et Noct4 dans la dysfonction endothéliale et la régulation de ce dernier dans un modèle d'allogreffe cardiaque chez le rat (Quillard *et al.*, 2010, 2009, 2008). Plus récemment, nous avons pu montré une proximité entre l'expression du ligand DLL4 par la CE et la sécrétion d'IL-6 (Pabois *et al.*, 2014). Ce travail s'inscrit donc dans la continuité de ces premières observations. Ainsi l'objectif principal de cette étude a été de définir l'implication de la voie de signalisation Notch au cours du rejet aigu humoral (AMR) dans une cohorte de patients transplantés cardiaques. L'étude présentée dans cette première partie s'est notamment intéressée au rôle du ligand DLL4 et de l'IL-6 au cours de l'interaction CE/macrophages dans un contexte de transplantation.

Cohorte :

Pour cette étude, nous avons réalisé une analyse rétrospective sur 22 biopsies endomyocardiques (EMB) issues de 22 greffons cardiaques. Ces EMB ont été séparé en deux groupes en fonction de leur grade pAMR, 13 EMB contrôles de grade pAMR0 ont ainsi été comparées à 9 EMB pAMR2. L'inclusion des EMB pAMR2 a été réalisée sur la base d'une positivité histologique (inflammation microvasculaire, fibrose) et immunohistochimique (C4d+ et CD68+) du rejet (Tableau 2) en accord avec les recommandations de l'ISHLT 2013 (Berry *et al.*, 2013).

EMB	Sexe du receveur	C4d	CD68+	DSA anticorps anti-HLA de classe I	DSA anticorps anti-HLA de classe II	pAMR
AMR 1	H	+	+	-	DR53	pAMR2
AMR 2	H	+	+	A02 B44	DR07 DR16 DR51 DQ03	pAMR2
AMR 3	H	+	+	-	DR04	pAMR2
AMR 4	H	+	+	-	DQ04 DR08	pAMR2
AMR 5	F	+	+	-	DR13	pAMR2
AMR 6	F	+	+	A01	DQ02 DQ07 DR07	pAMR2
AMR 7	F	+	+	-	DQ08	pAMR2
AMR 8	H	+	+	-	DQ02 DR3 DR7 DR53	pAMR2
AMR 9	F	+	+	A11 A66 B38	DQ02 DR07 DR53	pAMR2

Tableau 1 : Caractéristiques histologiques, immunohistochimiques et détection de DSA des 9 greffons présentant un AMR inclus dans l'étude (H, Homme ; F, Femme ; D'après le manuscrit de thèse d'Angélique Paboïs)

Résumé :

Au cours de ce travail, nous avons analysé en premier lieu l'expression transcriptionnelle de deux composants de la voie de signalisation Notch, le récepteur Notch4 et le ligand Dll4 dans les biopsies endomyocardiques du groupe contrôle (pAMR0) et pathologique (pAMR2). Ainsi nous avons pu montrer une augmentation significative de l'expression du ligand Dll4 en parallèle d'une diminution de l'expression du récepteur Notch 4 dans les biopsies AMR positives. Par une analyse en immuno-histofluorescence nous avons été à même de préciser *in situ* que l'expression de Dll4 est fortement induite dans les CE des capillaires mais également dans les macrophages intravasculaires infiltrant le greffon au cours du rejet humoral. Afin d'identifier le rôle de la régulation de l'expression de Dll4 au cours du rejet, nous avons reproduit, *in vitro*, un modèle de co-culture CE/monocytes allogéniques. Nous avons par la suite analysé l'impact d'une augmentation d'expression de Dll4 par les CE sur la physiologie du macrophage. Par cette méthode, nous avons été capables de montrer que l'augmentation de l'expression de ce ligand active fortement la voie de signalisation Notch dans les monocytes *via Hes1*. L'analyse phénotypique de ces monocytes/macrophages co-

cultivés montre l'acquisition d'un profil pro-inflammatoire M1 par la surexpression de marqueurs de surface M1 (CD40 et CD64) et la diminution de l'expression de marqueurs M2 (CD11b et CD200R). Par ailleurs l'étude transcriptionnelle de ces macrophages confirme les premières observations avec une surexpression du facteur de transcription M1, IRF5, et par l'augmentation de l'expression des transcrits de molécules solubles de l'inflammation telles que l'IL-1 β , l'IL-6, l'IL-8 et le TNF- α . De même, aucune régulation de l'IL-10 ou de l'Arginase-1, deux marqueurs M2 n'a été observée.

De plus, comme il l'a été montré précédemment par l'équipe, la surexpression de Dll4 induit la production de l'IL-6 par les cellules endothéliales. Les rôles respectifs de Dll4 et de l'IL-6 sur la différenciation macrophagique ont donc été analysés, en dehors du modèle de coculture. Nous avons, de cette manière et sur la base des marqueurs étudiés, pu mettre en évidence que l'IL-6 est responsable de l'augmentation de l'expression du marqueur M1 CD64 alors que la protéine recombinante humaine Dll4 immobilisée entraîne la diminution de l'expression des marqueurs M2 CD11b et CD200R. Ces résultats suggèrent un rôle complémentaire de ces deux protéines pour la polarisation des macrophages vers un profil pro-inflammatoire. Par ailleurs, nous avons confirmé que l'expression de Dll4 par les CE entraîne une expression de Dll4 par les macrophages et que cette induction de l'expression est contact dépendante. Enfin, en validation de ces résultats, nous avons identifié dans les biopsies endomyocardique de grade pAMR2, la présence en position sous endothéliale de cellules CD68+ Dll4+ IRF5+ confirmant la présence de macrophage M1 intravasculaire ayant acquis l'expression du ligand Dll4 par contact avec l'endothélium.

L'ensemble de ces résultats replacé dans le contexte de la transplantation suggèrent que la régulation de l'expression du ligand Notch Dll4 et de l'IL-6 par l'endothélium vasculaire du greffon permet la polarisation des macrophages vers un phénotype pro-inflammatoire M1 et participe au maintien et à l'amplification de l'inflammation intravasculaire. Ces mécanismes peuvent conduire à l'endommagement de l'endothélium vasculaire du greffon, la thrombose, l'ischémie et le rejet de l'allogreffe cardiaque.

Article n°1

Biochemical Pharmacology 104 (2016) 95–107



Contents lists available at ScienceDirect

Biochemical Pharmacology

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

Notch signaling mediates crosstalk between endothelial cells and macrophages via Dll4 and IL6 in cardiac microvascular inflammation



Angélique Paboïs^{a,b,c,1}, Sylvain Pagie^{a,b,c,1}, Nathalie Gérard^{a,b}, Christian Laboisse^d, Sabine Pattier^e, Philippe Hulin^{c,f}, Steven Nedellec^{c,f}, Claire Toquet^d, Béatrice Charreau^{a,b,c,*}

^aINSERM UMR1064, Centre de Recherche en Transplantation et Immunologie, LabEx IGO and LabEx Transplantex, Nantes F44000, France

^bCHU de Nantes, Institut de Transplantation-Urologie-Néphrologie, ITUN, Nantes F44000, France

^cLUNAM Université de Nantes, Faculté de Médecine, Nantes F44000, France

^dService d'Anatomie Pathologique, CHU de Nantes, Nantes F44000, France

^eService de transplantation cardiaque, CHU de Nantes, Nantes F44000, France

^fPlateforme MicroPCell SFR Santé – IRT, Nantes, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 November 2015

Accepted 22 January 2016

Available online 28 January 2016

Keywords:

Notch signaling
Endothelial cells
Macrophage polarization
Cardiac transplant

ABSTRACT

Although short-term outcomes have improved with modern era immunosuppression, little progress has been made in long-term graft survival in cardiac transplantation. Antibody-mediated rejection (AMR) is one of the leading causes of graft failure and contributes significantly to poor long-term outcomes. Endothelial cell (EC) injury, intravascular macrophage infiltrate and microvascular inflammation are the histological features of AMR. Nevertheless, mechanisms of AMR remain unclear and treatment is still limited. Here, we investigated the mechanisms underlying vascular and inflammatory cell network involved in AMR at endothelial and macrophage levels, using endomyocardial transplant biopsies and EC/monocyte cocultures. First, we found that AMR associates with changes in Notch signaling at endothelium/monocyte interface including loss of endothelial Notch4 and the acquisition of the Notch ligand Dll4 in both cell types. We showed that endothelial Dll4 induces macrophage polarization into a pro-inflammatory fate (CD40^{high}CD64^{high}CD200R^{low} HLA-DR^{low}CD11b^{low}) eliciting the production of IL-6. Dll4 and IL-6 are both Notch-dependent and are required for macrophage polarization through selective down and upregulation of M2- and M1-type markers, respectively. Overall, these findings highlight the impact of the graft's endothelium on macrophage recruitment and differentiation upon AMR via Notch signaling. We identified Dll4 and IL-6 as coregulators of vascular inflammation in cardiac transplantation and as potential targets for immunotherapy.

© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Antibody-mediated rejection (AMR) of the cardiac allograft is a recognized clinical complication in the management of heart transplant patients. AMR is found in about 6–10% of heart transplant

patients [1,2]. AMR occurs early (acute AMR) or late (chronic AMR) after transplantation and is associated with progression to cardiac allograft vasculopathy (CAV) and poor graft outcome [3]. The pathogenesis of AMR is caused by the deposition of donor specific alloantibodies (DSA) targeting HLA molecules (mostly HLA class II even in association with HLA class I) in the vasculature of the graft [3]. Downstream mechanisms include activation of the complement cascade, secretion of cytokines and endothelial cell (EC) injury. Several cytokines are implicated in transplant cellular rejection and CAV including IL1 α , IL-6, IL-17, IFN- γ and TNF [4–6]. In contrast, the cytokines associated with cellular immunity and vascular inflammation upon AMR and their functional hierarchy is still unclear.

Histological features of AMR in heart transplants include microvascular inflammation, intravascular macrophage adherence to capillaries and EC swelling supporting a role for endothelium/

Abbreviations: ADAM, a disintegrin and a metalloproteinase; AMR, antibody-mediated rejection; Arg1, Arginase 1; CAV, cardiac allograft vasculopathy; CBFI, C promoter Binding Factor 1; DAPT, N-[N-(3,5-Difluorophenacetyl)-L-alanyl]-Sphenylglycine t-butyl ester; Dll, Delta-like; DSA, donor specific alloantibodies; EMB, endomyocardial biopsies; Hes, hairy enhancer of split; Hey, hairy related; IRF5, Interferon regulatory factor 5; NFH, non failing heart; NICD, Notch intracellular domain.

* Corresponding author at: INSERM UMR1064, 30 bd J. Monnet, 44093 Nantes cedex 01, France.

E-mail address: Beatrice.Charreau@univ-nantes.fr (B. Charreau).

¹ Both authors contributed equally.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2016.01.016>

0006-2952/© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

macrophage interaction in the pathogenesis of AMR [7]. Although detection of macrophages in endomyocardial transplant biopsies (EMB), based on the surface expression of CD68, is of diagnostic importance [7], infiltrating macrophages have not been further delineated in terms of subpopulations or activation markers. Consequently, we speculate that further description of macrophage subsets infiltrating grafts in response to DSA as well as the underlying molecular mechanisms are needed for our understanding of graft inflammation and its resolution.

Notch is a highly conserved cell–cell communication pathway with multiple functions in development and tissue homeostasis [8]. In humans, the Notch family members include four transmembrane receptors (Notch1 to Notch4) and two families of Notch ligands (Delta-like 1 (Dll1), Dll3, Dll4, Jagged1, or Jagged2). Notch activation is initiated via the receptor cleavage by the disintegrin and metalloproteinases ADAM10 or ADAM17 and results in the release and nuclear translocation of Notch intracellular domain (NICD) [9]. NICD association with the DNA-binding factor RBP-J κ /CBF-1 induces the transcription of Notch target genes including members of the *hair enhancer of split* (Hes) or *hair related* (Hey and Hrt) gene families [10]. Notch signaling is of particular importance in vascular development, vessel specification and homeostasis [11,12]. Notch signaling also participates in immune cell development, maturation, activation [13] and play a role in T cell alloimmunity in organ transplantation [14]. Our previous studies reported on qualitative changes on Notch receptor/ligand at EC surface in response to inflammation [15,16] and on Notch signaling mediating EC dysfunction during transplant arteriosclerosis [17] and inflammatory response [18]. Although a function for Notch signaling in the monocyte/macrophage lineage is emerging [19,20], its role in communication between ECs and monocytes/macrophages is unknown. The present study investigated Notch signaling in human cardiac transplants upon AMR at endothelial and macrophage levels. Mechanisms of EC/macrophage communication controlled by Notch signaling were further explored using primary EC cultures from transplant donors and purified CD14⁺ monocytes in coculture experiments to identify regulatory mediators.

2. Materials and methods

2.1. Patients and samples

Endomyocardial biopsies (EMB) from 22 transplanted patients who underwent heart transplantation between 1996 and 2010 at the Thorax Institute (CHU de Nantes, France) were included in this retrospective analysis. Samples include EMB from 9 transplants undergoing AMR (pAMR2). Previous histology analysis for diagnosis revealed intravascular CD68⁺ cell infiltrates and CD4d deposit associated with anti-HLA class II (9/9) and class I (3/9) donor specific antibodies in transplant recipients, for all EMB, consistent with pAMR2 classification. Only few CD3⁺ T cells were detected on EMB while no staining was found for CD20, CD138 and CD56. A control group consisting of transplant EMB from recipients ($n = 13$) with a non failing heart (NFH) and with no antibodies against class I or class II HLA after transplantation was used. Serologic testing for anti-HLA class I and class II antibodies before and after transplantation was performed by routine protocols using Luminex assays (Labscreen; One Lambda, Canoga Park, CA) at the HLA laboratory (EFS Pays de la Loire, Nantes, France). This study was performed according to the guidelines of the local ethics committee (CCPRB, CHU de Nantes, France). Before inclusion in the study, consents were obtained for the collection and the use of EMB for research purposes.

2.2. EC isolation, culture and activation

Primary EC cultures have been prospectively isolated from transplant donors at the time of transplant surgery (French Health Minister project number 02G55) and grown as we described previously [21]. ECs were cultured in EC basal medium (ECBM; Promocell, Heidelberg, Germany) supplemented with 10% 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 (Life Technologies, Cergy-Pontoise, France) and 0.1 mg/ml streptomycin (Life Technologies) at 37 °C in a 5% CO₂ humidified air incubator. Activation assays were performed in 6-well plates on post-confluent EC monolayers. For activation, ECs were cultured with recombinant human TNF (200 U/ml, R&D Systems Europe Ltd, Abingdon, UK) The Transwell[®] experiments were performed using Transwell inserts (24-well type; Corning Costar, Sigma Aldrich, Lyon, France) with 0.4 μ m pores. ECs were plated on 24-well plates and grown to confluence. Transwell[®] inserts were inserted onto the wells, monocytes (5×10^5 cells) were seeded on the inserts and cultured for 18 h. Next, monocytes and ECs were harvested for analyses.

2.3. Recombinant adenoviruses for Dll4 and Notch intracellular domain and transduction of ECs

Recombinant adenoviral vectors for human Dll4 and the Notch2 ICD (NICD) were constructed and used as we previously reported [15,18]. Recombinant adenoviruses were produced in Human Embryonic Kidney 293 cells by the vector core laboratory of the University Hospital of Nantes (INSERM UMR1087 Gene Therapy Laboratory, Nantes, France). An empty adenovirus (Adnull), encoding no transgene, was used as a control. ECs were cultured in six-well plates at 70% confluence and infected with a multiplicity of infection (MOI) ranging from 5 to 50 infectious particles/cell. Adenoviral infections were carried out in ECBM supplemented with 1% FCS at 37 °C and 5% CO₂. Transduction efficiency was analyzed 24 h after infection by GFP analysis by fluorescence microscopy and quantified by flow cytometry using a FACScanto II[™] (BD, Mountain View, CA, USA). Transduction efficiency was nearly 100% for both recombinant adenoviruses.

2.4. Monocytes isolation, in vitro polarization and cocultures with ECs

CD14⁺ monocytes were purified (purity >85%) by counterflow centrifugal elutriation from human PBMC (healthy volunteers, $n > 10$) by the DTC core-facility (CIC BT0503, Nantes, France). ECs were transduced with recombinant adenoviruses 24 h before co-culture experiments. When applicable, monocytes were incubated with LPS (100 ng/ml, Sigma Aldrich) and IFN- γ (100 U/ml, Imukin[®], Boehringer, Ingelheim, Germany). Recombinant Notch ligand Dll4-human Fc fusion protein (5 μ g/ml; R&D Systems) was immobilized onto tissue culture plates *via* overnight incubation. When applicable, monocytes were incubated with recombinant human IL-6 (20 ng/ml; Sigma Aldrich) or DAPT (N-[N-(3,5-Difluorophenacetyl)-L-alanyl]-Sphenylglycine t-butyl ester; 10 μ M; Sigma Aldrich). Blocking experiments were performed in the presence of anti-IL-6R mAbs (0.15 μ g/ml, from R&D Systems) or irrelevant mAbs as control.

For immunolabeling, monocytes were stained with the following anti-human mAbs: anti-CD11b-Pacific blue, anti-CD40-FITC, anti-CD64-FITC, anti-CD80-APC-H7, anti-CD86-APC, anti-CD163-PE, anti-CD206-PE (BD Biosciences, San Diego, CA) and anti-CD200R-Alexa647 (Abd Serotec, Oxford, UK). Coexpression of Dll4 and Notch2 at cell surface was assessed by co-staining using anti-Dll4-Violblue and anti-Notch2-APC antibodies respectively (Miltenyi Biotec, Paris, France). Fluorescence was measured on 50,000 cells/

sample using a FACS Canto II® (BD Biosciences) and analyzed using FlowJo® 7.6.1 software (Tree Star, Inc., Ashland, OR). Dead cells were excluded from analysis with a DAPI staining (1:30,000 dilution; Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA).

2.5. Messenger RNA and quantitative RT-PCR

Total RNA was isolated using Trizol reagent (Life Technologies). After phenol–chloroform extraction and isopropanol precipitation, RNA were treated with ribonuclease-free Turbo-DNase (Life Technologies) before reverse transcription. RNA was reverse-transcribed with Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Life Technologies) according to the manufacturer's instructions. Real-time quantitative PCR was performed in a Viia™ 7 sequence detection application program using labeled TaqMan probes (Life Technologies). Hypoxanthine-guanine phosphoribosyl-transferase-1 (HPRT-1) (Hs99999909_m1) was used as an endogenous control to normalize for variations in the starting amount of RNA. For the others markers, the following ready-to-use primers/probe mixes were used (Life Technologies): ADAM10 (Hs00153853_m1), ADAM17 (Hs01041915_m1), Notch1 (Hs01062014_m1), Notch2 (Hs01050702_m1), Notch3 (Hs01128541_m1), Notch4 (Hs00270200_m1), Dll4 (Hs00184092_m1), Jag1 (Hs01070036_m1), Hes1 (Hs00172878_m1), Hey1 (Hs01114113_m1), VCAM-1 (Hs00365486_m1), IRF5 (Hs00158114_m1), Arginase 1 (Hs00968979_m1), IL-6 (Hs00174131_m1), IL-8 (Hs001741038_m1), IL-1β (Hs01555410_m1), TNF (Hs01113624_g1), IL-10 (Hs0096122_m1), CD40 (Hs01002913_g1), CD80 (Hs00175478_m1) and CD86 (Hs00199349_m1). When applicable, relative expression was calculated according to the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method, in which the reference represents 1-fold expression.

2.6. Immunohistochemistry and immunofluorescence on EMB

Serial sections from frozen EMB were stained using a three-step immuno-peroxidase protocol. Four micrometer-thick sections were dried overnight at room temperature and fixed for 10 min in acetone. After rehydration in PBS, tissue sections were sequentially incubated for 30 min with primary and secondary antibodies. The chromogen used was 3,3'-diaminobenzidine tetra-hydrochloride and tissue sections were counterstained with H&E. Appropriate negative controls (omission of the primary antibody) were used throughout. For immunohistochemistry, rabbit polyclonal anti-ADAM10 antibodies were obtained from Chemicon (Temecula, CA, USA; 1:1000 dilution) and mAbs directed against ADAM17, CD31, CD68 and VCAM-1 (10 µg/ml) were purchased from R&D Systems. For immunofluorescence, tissue sections were washed with PBS and blocked with 4% donkey or goat serum diluted in PBS for 1 h. Tissue sections were then incubated with primary antibodies at 4 °C, followed by fluorescent secondary antibodies and nuclear staining (DAPI; Invitrogen). Double staining for Notch4 (anti-Notch4 mouse mAb; 1:1000 dilution, Abcam, Cambridge, UK) and CD31 have been revealed using anti-mouse IgG-Alexa 568 and anti-rabbit IgG-Alexa 488; Life Technologies). Dll4 expression and double staining for Dll4 (rabbit polyclonal antibody, Abcam) and IRF5 (Serotec; 1:50 dilution) or CD68 (clone KP1, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany) have been revealed using anti-rabbit IgG-Alexa 568 or anti-rabbit IgG-Alexa 488 and anti-mouse IgG1-Alexa647 (Life Technologies). Specimens were analyzed by confocal fluorescence microscopy (Nikon A1 RSi, Champigny-Marne, France) and the Fiji free software [22].

2.7. ELISA

For quantification of cytokines and soluble mediators, culture supernatants were analyzed in triplicate using sandwich ELISA

for IL-6 (DuoSet, R&D Systems), IL-10 (BD OptEIA™, BD Biosciences) and VEGF-R1 (Quantikine ELISA Kit, R&D Systems), respectively, according to the manufacturer's instructions.

2.8. Statistical analysis

Data are expressed as mean ± SEM and compared using non parametric Mann–Whitney test, Kruskal–Wallis test (with Dunn's multiple comparison post-test) if there were more than two conditions or Wilcoxon matched-pair test if compare to normalized values. A *p* value <0.05 was considered statistically significantly different. In all figures, one asterisk (*) denotes *p* < 0.05, two asterisks (**) denotes *p* < 0.01 and three asterisks (***) denotes *p* < 0.001.

3. Results

3.1. Endothelial cell activation in AMR associates with regulation of Notch activating proteases

Mechanisms and signal transduction involved in DSA-mediated rejection were investigated in a retrospective analysis of cardiac transplant EMB. Patient demographic data are reported in Table 1. Our study cohort included transplants with biopsy-proven AMR (pAMR2 according to Banff 2013 classification, *n* = 9) and non failing hearts (NFHs; *n* = 13) as controls. EMB were used for histology, immunohistochemistry and QPCR. Histology identified evidence of microvascular inflammation characterized by EC swelling and a diffuse interstitial or intravascular mononuclear cell infiltrate in transplants with AMR (Fig. 1A). Immunostaining indicated that micro-inflammation correlated with a consistent CD68⁺ macrophage infiltrate (Fig. 1A). The functional phenotype of vascular ECs was examined in the grafts using immunostaining for the adhesion molecule VCAM-1 and the disintegrin and metalloproteinases ADAM10 and ADAM17. VCAM-1 expression was not expressed in NFH but strongly induced on graft ECs in AMR (Fig. 1B). A significant increase in VCAM-1 mRNA steady state level was found in transplants with AMR (3.15 ± 1.70-fold increase compared to NFH, *p* < 0.01; Fig. 1C). ADAM10 and ADAM17, both involved in inflammatory proteolytic events [23], were also found up-regulated during AMR. In NFH, ADAM10 staining mostly localized in CD31⁺ ECs in capillaries and small caliber arteries as we previously described [18] while ADAM17 was only restricted to smooth muscle fibers of arteries (Fig. 1B). AMR associates with

Table 1
Demographic data.

Patients	Controls NFH <i>n</i> = 13	AMR <i>n</i> = 9
<i>Recipients</i>		
Age (years; mean ± SD)	52 ± 20	34 ± 14
Gender male/female (% of male)	9/4 (69.2%)	6/3 (66.6%)
Post-graft follow-up time (months; mean ± SD)	110.6 ± 72.8	118.6 ± 55.7
Time to post-graft rejection episode defined by DSA appearance (months; mean ± SD)	0	65.41 ± 58.44
Grade of AMR (Banff classification)	pAMR0 (100%)	pAMR2 (100%)
<i>Nature of DSA</i>		
Anti-HLA class I	0	3
Anti-HLA class II	0	6
Anti-HLA class I + II	0	3
Positive c4d (%)	0 (0.00%)	9 (100%)
Positive CD68 (%)	0 (0.00%)	9 (100%)

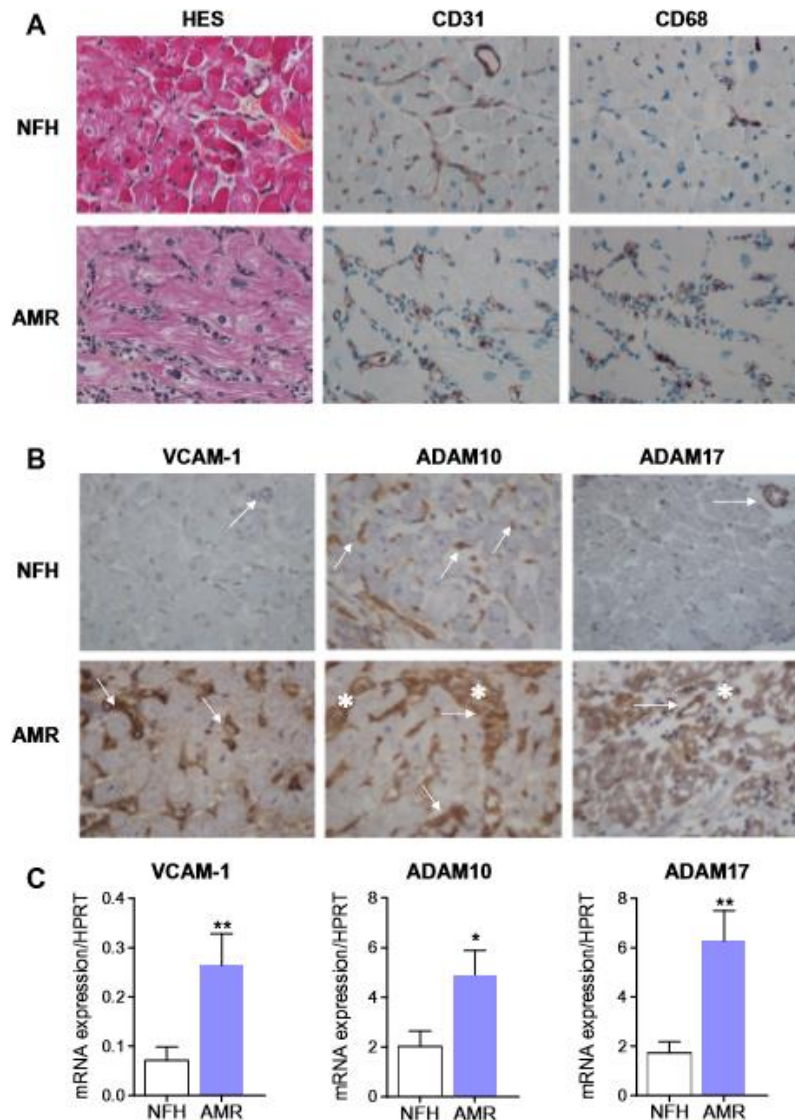


Fig. 1. Intravascular inflammation in AMR associates with regulation of VCAM-1, ADAM10 and ADAM17 in cardiac transplants. (A) Representative histological analysis (hematoxylin and eosin staining, HES) and immunostaining for CD31 and CD68 in cardiac transplants without (NFH) or with AMR (AMR) (magnification: ×400). (B) Representative immunostaining for VCAM-1, ADAM10 and ADAM17 in transplant biopsies without (NFH) or with AMR (AMR) (magnification: ×400). White arrows and stars point at capillary ECs and intravascular macrophages, respectively. (C) Transcript levels for VCAM-1, ADAM10 and ADAM17 in EMB from cardiac transplants without (NFH; n = 13) or with AMR (AMR; n = 9) quantified by QRT-PCR. Results show the mean ± SEM and are expressed as relative expression calculated according to the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method, after normalization to HPRT-1 levels. Mann-Whitney test was used to statistically compare the two groups (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

both qualitative and quantitative changes in ADAM10 and ADAM17 expression with a concomitant and strong expression of ADAM10 and ADAM17 in graft ECs and in intravascular CD68⁺ macrophages. QPCR confirmed enhanced levels for ADAM10 (2.30 ± 1.25 -fold increase versus NFH, $p < 0.05$) and ADAM17 (2.20 ± 1.70 -fold increase versus NFH, $p < 0.05$) in AMR. Together, these findings indicate that AMR is characterized by a robust endothelial activation reflected by the expression of VCAM-1, required for the firm adhesion of leukocytes to the endothelium, and of ADAM10 and ADAM17, two proteases involved in inflammation, leukocytes recruitment and Notch signaling.

3.2. ECs and intravascular macrophages acquire Dll4 expression upon AMR

ADAM10 and ADAM17 are both involved in the proteolytic events initiating Notch signaling [24]. Thus we sought to examine regulation of the Notch pathway in transplant biopsies. We focused on Notch4 and Dll4, two Notch members with a restricted expression in ECs [25,26] and myeloid-derived macrophages and dendritic cells [27]. In cardiac tissue sections, Notch4 staining was confined to the EC layer in both NFH and AMR and overlapped with the endothelial CD31 staining. Notch4 was found strictly located at the apical

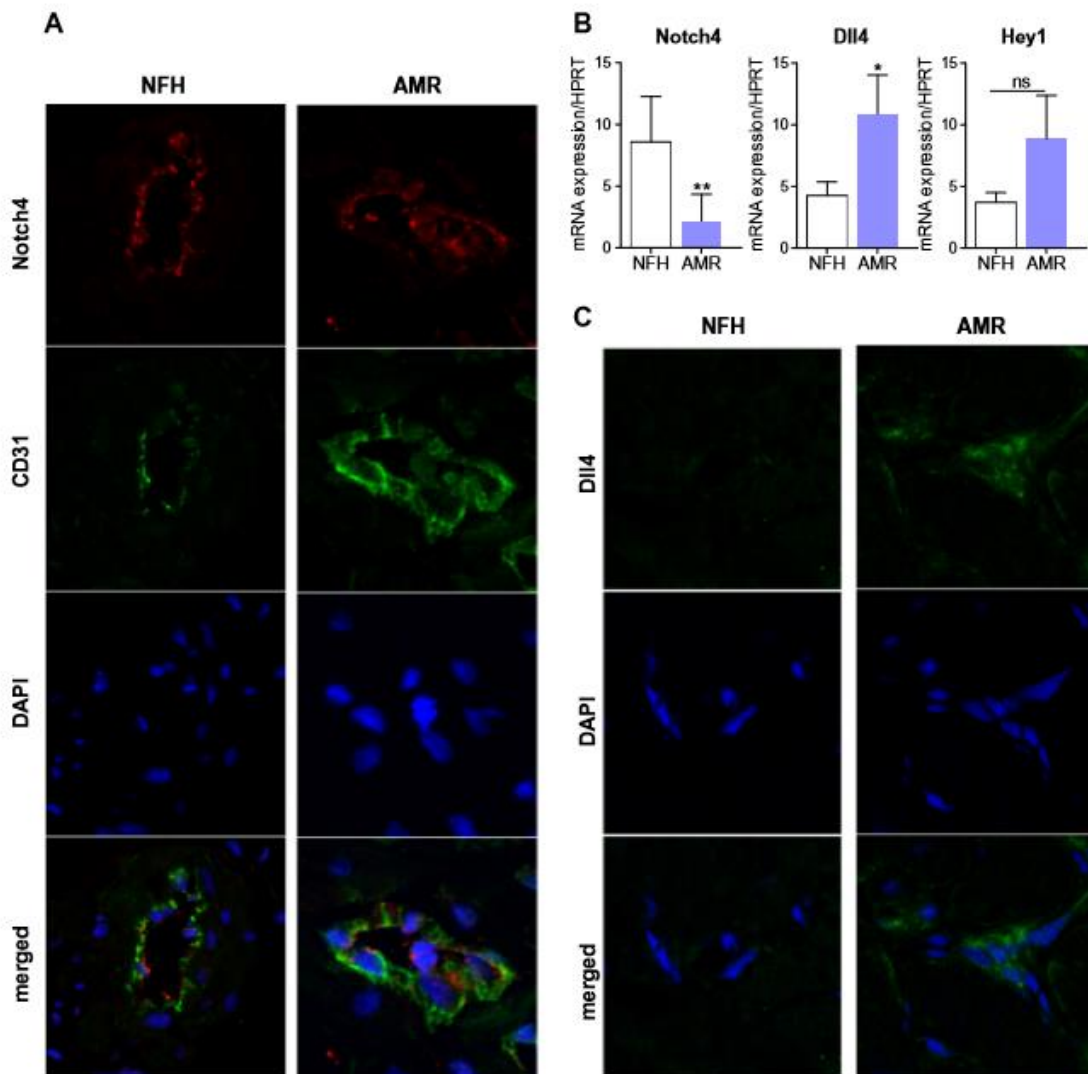


Fig. 2. Opposite regulation for Notch4 and Dll4 upon AMR. (A) Coimmunostaining for CD31 (green) and Notch4 (red) in EMB from cardiac transplants without (NFH) or with AMR (AMR). Nuclei are stained with DAPI (blue) and costainings are visualized as superimposition of images (merged). (magnification: $\times 600$). (B) Quantification of transcripts for Notch4, Dll4 and Hey1 in EMB from cardiac transplants without (NFH; $n = 13$) or with AMR (AMR; $n = 9$) by QRT-PCR. Results show the mean $\pm$ SEM and are expressed as relative expression calculated according to the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method, after normalization to HPRT-1 levels. Mann-Whitney test was used to statistically compare the two groups ($p < 0.05$; $p < 0.01$. ns – not significant). (C) Immunostaining for Dll4 (green) in transplants without (NFH) or with AMR (AMR). Nuclei are staining with DAPI (blue) and costainings are visualized as superimposition of images (merged) (magnification: $\times 600$).

side of the EC membrane suggesting a polarization for the Notch4 receptor (Fig. 2A and Supplemental Video S1). QPCR demonstrated a significant quantitative decrease in Notch4 mRNA levels in AMR biopsies (5.10 ± 2.40 -fold decrease compared to NFH group, $p < 0.01$) (Fig. 2B). In NFH, Dll4 was not detectable suggesting no, or very faint, basal Dll4 in normal heart. Immunostaining for Dll4 revealed a strong induction of Dll4 in both ECs and intravascular macrophages in transplants with AMR (Fig. 2B and C). QPCR further confirmed a significant induction for Dll4 (4.10 ± 0.23 -fold increase, $p < 0.05$) in grafts suffering AMR. Associated with changes for Notch4 and Dll4 we found a trend to an enhanced transcript level for Notch transcription factor *Hey1* that may reflect an overall regulation of the Notch pathway in AMR. Thus analysis of EMB

highlighted changes in Notch signaling at endothelium/monocyte interface in AMR and provided the first evidence of an acquisition of the Notch ligand Dll4 in both cell types.

3.3. In vitro inflammation recapitulates changes in Notch observed in transplants with AMR

Cultures of primary ECs, isolated from donor transplants, have been used to determine the effect of inflammation on Notch in ECs. ECs were treated with TNF and expression of Notch4, Dll4, ADAM17 and VCAM-1 was analyzed by QPCR and flow cytometry. As expected, TNF induced a strong and significant expression of VCAM-1 and ADAM17 transcripts and proteins (Fig. 3A and B)

validating EC activation. Consistent with our previous study [16], TNF also strongly affected the pattern of Notch receptors by decreasing Notch4 (2.90 ± 0.16 -fold decrease versus control) at the mRNA level (Fig. 3A). Dll4 was upregulated in ECs in response to TNF with a 6.10-fold increase in transcript steady state level compared to control (Fig. 3A) correlated with a slight increase in Dll4 protein expression (Fig. 3B). These data demonstrate that an inflammatory cytokine (i.e. TNF) drives phenotypic changes in Notch pattern expressed on vascular ECs toward loss of a receptor (Notch4) and gain of a ligand (Dll4). These regulations are similar to *in situ* data obtained on AMR biopsies. We used a recombinant adenovirus encoding for the human Dll4 cDNA to allow an ectopic Dll4 expression in vascular endothelium *in vitro*. The efficacy of Dll4 transduction in ECs was validated at mRNA and protein levels as we previously described [18]. Here we show that forced expression of Dll4 drastically inhibits Notch4 expression in ECs (Fig. 3C) suggesting a feedback regulatory effect of Dll4 on Notch4.

3.4. Dll4 on endothelium triggers a bidirectional Notch signaling in both ECs and monocytes

Since Dll4 was found induced in both ECs and macrophages upon AMR, we further investigated the role of Dll4 in cellular co-culture models using Dll4 transduced ECs and CD14⁺ purified monocytes isolated from healthy volunteers. After cocultures, monocytes and EC cultures were harvested separately for analyses. The impact of Dll4 expression on EC cultures was also examined in parallel experiments. Transduction of Dll4 in ECs significantly increased the Notch target genes *Hes1* and *Hey1* in vascular ECs (Fig. 4A) suggesting that Dll4 expression at cell surface is sufficient to conduct effective Notch signaling in neighboring ECs. In cocultures, endothelial Dll4 induced *Hes1* mRNA in monocytes (Fig. 4B) supporting the concept that endothelial Dll4 engages Notch signaling in contacting monocytes. Further, immobilized recombinant human Dll4 (rhDll4) also upregulates *Hes1* signaling

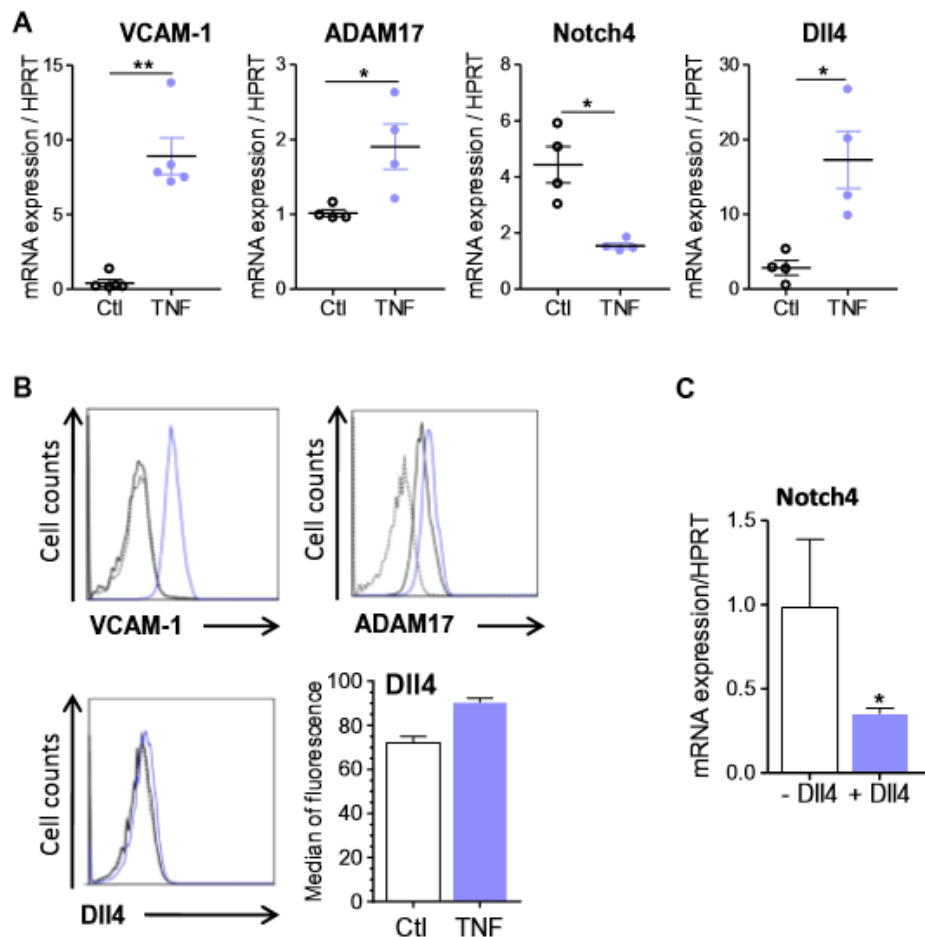


Fig. 3. Regulation of ADAM17, Notch4 and Dll4 in cultured ECs in response to TNF and regulatory effect of Dll4 on Notch4. ECs were treated without (Ctrl) or with TNF (200 U/ml) for 24 h before analysis of transcripts and immunophenotyping. (A) Quantification of transcript levels for VCAM-1, ADAM17, Notch4 and Dll4 by QRT-PCR. Data show the mean $\pm$ SEM and are expressed as relative expression calculated according to the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method, after normalization to HPRT-1 levels. Mann-Whitney test was used to statistically compare the two groups (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$). Results shown are the mean $\pm$ SEM from four independent experiments performed in triplicate. (B) Representative FACS histograms showing cell surface expression analyzed by flow cytometry using anti-VCAM-1, -ADAM17 and -Dll4 antibodies and a quantitative analysis from 3 independent experiments for Dll4. Histograms show the intensity of fluorescence (log) for untreated (dark line) and TNF-treated (blue line) ECs. Immunostaining using IgG isotype control (dotted line) was used as a control. Data are representative of three independent experiments. (C) Notch4 transcript level in ECs transduced by a control (- Dll4) or Dll4 (+ Dll4) recombinant adenovirus was measured by QRT-PCR. Data are expressed as relative expression calculated according to the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method, after normalization to HPRT-1 levels. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

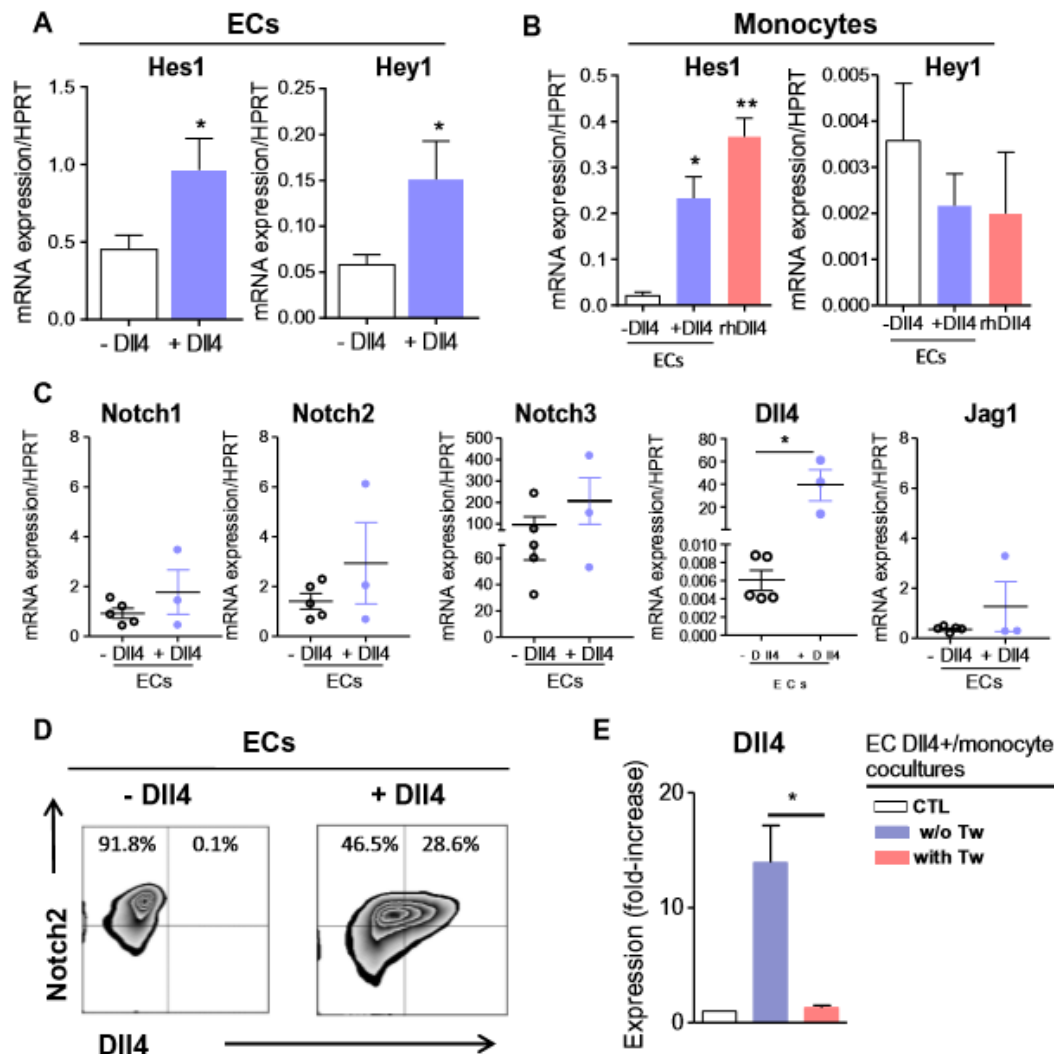


Fig. 4. Endothelial Dll4 triggers Notch signaling in ECs and monocytes. ECs were transduced by control (–Dll4) or Dll4 coding (+Dll4) recombinant adenovirus for 24 h and then co-cultured with or without CD14⁺ purified monocytes for 18 h. Transcript levels for Notch target genes *Hes1* and *Hey1* were quantified separately by QRT-PCR in both ECs (A) and monocytes (B). (C) Quantification of transcript levels for Notch receptors (Notch1, –2, –3) and ligands (Dll4, Jag1) in monocytes by QRT-PCR after coculture with ECs transduced by a control (–Dll4) or Dll4 (+Dll4) recombinant adenovirus. (D) Representative FACS analysis showing coexpression of Dll4 and Notch2 on monocytes after coculture with ECs transduced by a control (–Dll4) or Dll4 (+Dll4) adenovirus. Percentages for single (Notch2⁺) and double (Notch2⁺/Dll4⁺) cell subsets are indicated. (E) Induction of Dll4 on monocytes is contact-dependent. Dll4 expression was analyzed on monocytes before (CTL) and after coculture with Dll4-expressing ECs with or without Transwell (Tw). Monocytes were harvested and Dll4 was quantified by flow cytometry. Data expressed are means of MFI ± SEM from 3 experiments. Results shown are the mean ± SEM from at least three independent experiments performed in triplicate. Mann–Whitney test was used to statistically compare the different conditions (**p* < 0.05; ***p* < 0.01; ****p* < 0.001 versus Ctrl (–Dll4)).

in monocytes (Fig. 4B). In contrast, no regulation was found for the transcription factor *Hey1* supporting a specific role for *Hes1* in Dll4 signaling.

To explore the consequences of endothelial Dll4-driven Notch signaling on monocytes, ECs transduced with Dll4 were incubated with monocytes. Monocytes were then subjected to QPCR analyses. As shown in Fig. 4C, endothelial Dll4 had no effect on Notch1 (*p* = 0.5714), Notch2 (*p* = 0.5714), Notch3 (*p* = 1.00) and Jag1 (*p* = 1.00). Notch4 mRNA remains undetectable in monocytes (data not shown). However, a major effect of endothelial Dll4 was to strongly up-regulate Dll4 mRNA in monocytes (*p* = 0.057). This regulation was confirmed by flow cytometry (Fig. 4D). In the presence

of Dll4 expressing ECs (+Dll4), 28.6% of monocytes were positively stained for Dll4 (Fig. 4D). Cocultures performed using Transwell® membranes to separate ECs and monocytes strongly inhibited Dll4 induction on monocytes (*p* < 0.05; Fig. 4E).

3.5. Endothelial Dll4 polarizes macrophages to a M1 phenotype

Emerging data support a bilateral influence of Notch signaling and inflammation [28,29]. Recently, Notch signaling has been implicated in the phenotypic maturation/differentiation of monocytes [30,31] into functional cellular subsets referred to as polarization [32]. M1 and M2 macrophages are characterized by

specific phenotype and cytokine release [32]. Although macrophage polarization in graft rejection is almost unknown, we sought to explore whether endothelial Dll4 could play a role in macrophage polarization in the context of AMR. Flow cytometry analyses showed that Notch activity resulting from endothelial Dll4 associates with consistent phenotype changes on macrophage. As shown in Fig. 5, Dll4 induces the expression of at least two M1 markers, including CD40 ($16.50\% \pm 11.50\%$ versus $5.90\% \pm 6.40\%$, $p = 0.0151$) and CD64 ($19.10\% \pm 14.30\%$ versus $5.81\% \pm 5.95\%$, $p = 0.0133$). No significant change was found for CD80 and CD86, frequently reported as M1 markers (Fig. 5A). Endothelial Dll4 slightly reduces a set of M2 markers including CD200R, HLA-DR and CD11b but not the scavenger receptor CD163 (Fig. 5B). Macrophage differentiation

induced by endothelial Dll4, was further examined by QPCR for the quantification of intracellular M1 and M2 markers. These experiments also include ECs transduced with a recombinant adenovirus encoding a Notch intracellular domain (NICD) to activate the Notch pathway in ECs [15]. NICD transduction in ECs selectively induces Dll4 expression at EC surface [18]. As shown in Fig. 6A, endothelial Dll4 significantly increases the expression of IRF5 (Interferon regulatory factor 5), a specific transcription factor of M1 macrophages upregulating pro-inflammatory cytokines [33]. In contrast, no change was found for Arginase 1 (Arg1), a M2 marker (Fig. 6B). Immunofluorescence revealed costainings for both Dll4 and IRF5 and Dll4 and CD68 in intravascular leucocytes in EMB from transplant with AMR, consistent with a predominance of M1-type

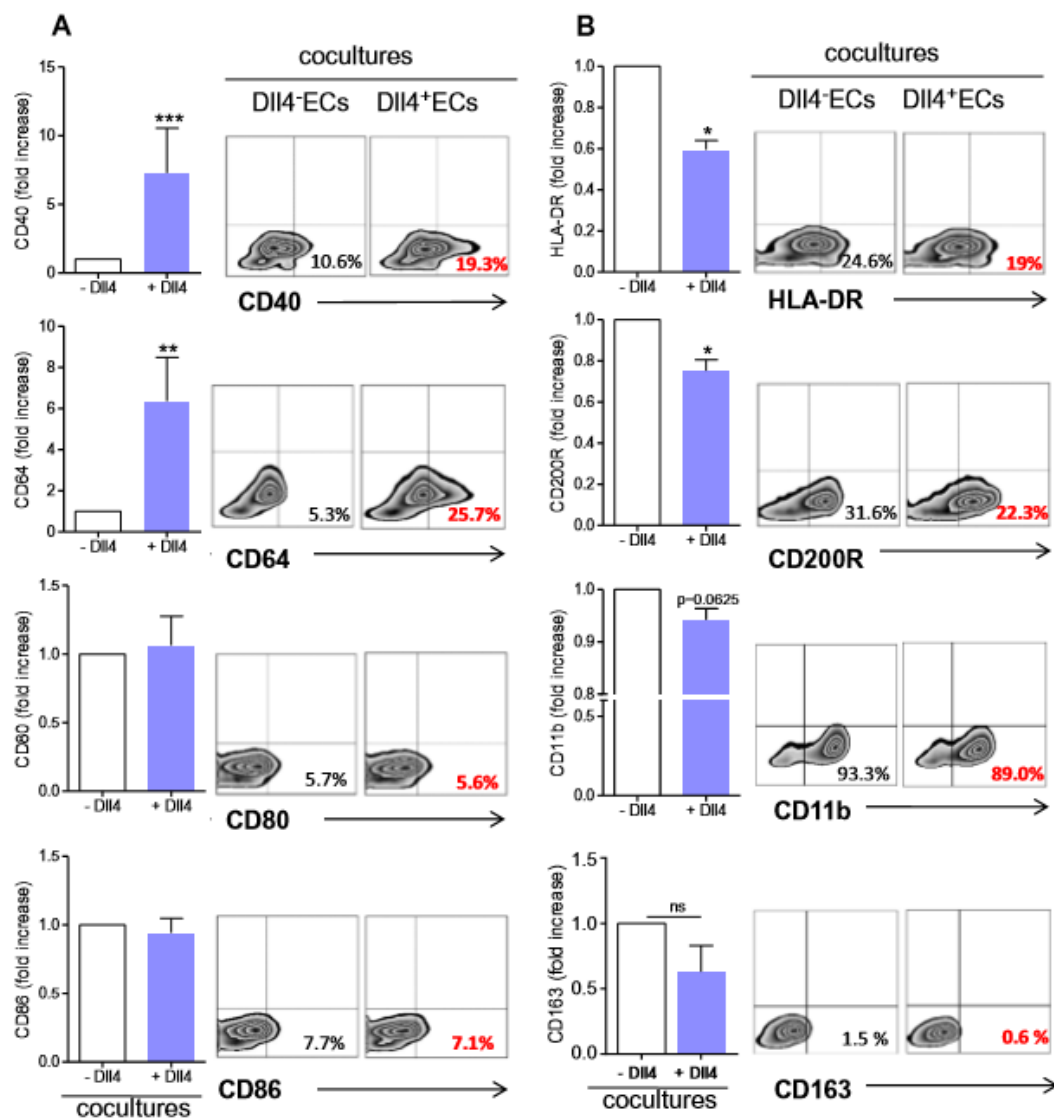


Fig. 5. Endothelial Dll4 triggers macrophage polarization to a M1 phenotype. ECs were transduced with control (- Dll4) or Dll4 (+ Dll4) adenovirus for 24 h and then cocultured with monocytes for 18 h. Phenotype of monocytes was analyzed by flow cytometry for a panel M1 (A) and M2 (B) markers. Quantification of positive cell subsets for each marker was obtained from at least three independent experiments (left panels). The right panels show representative FACS plots; the percentages of positive cells for each marker were indicated. Mann-Whitney test was used to compare different conditions (* $p < 0.05$).

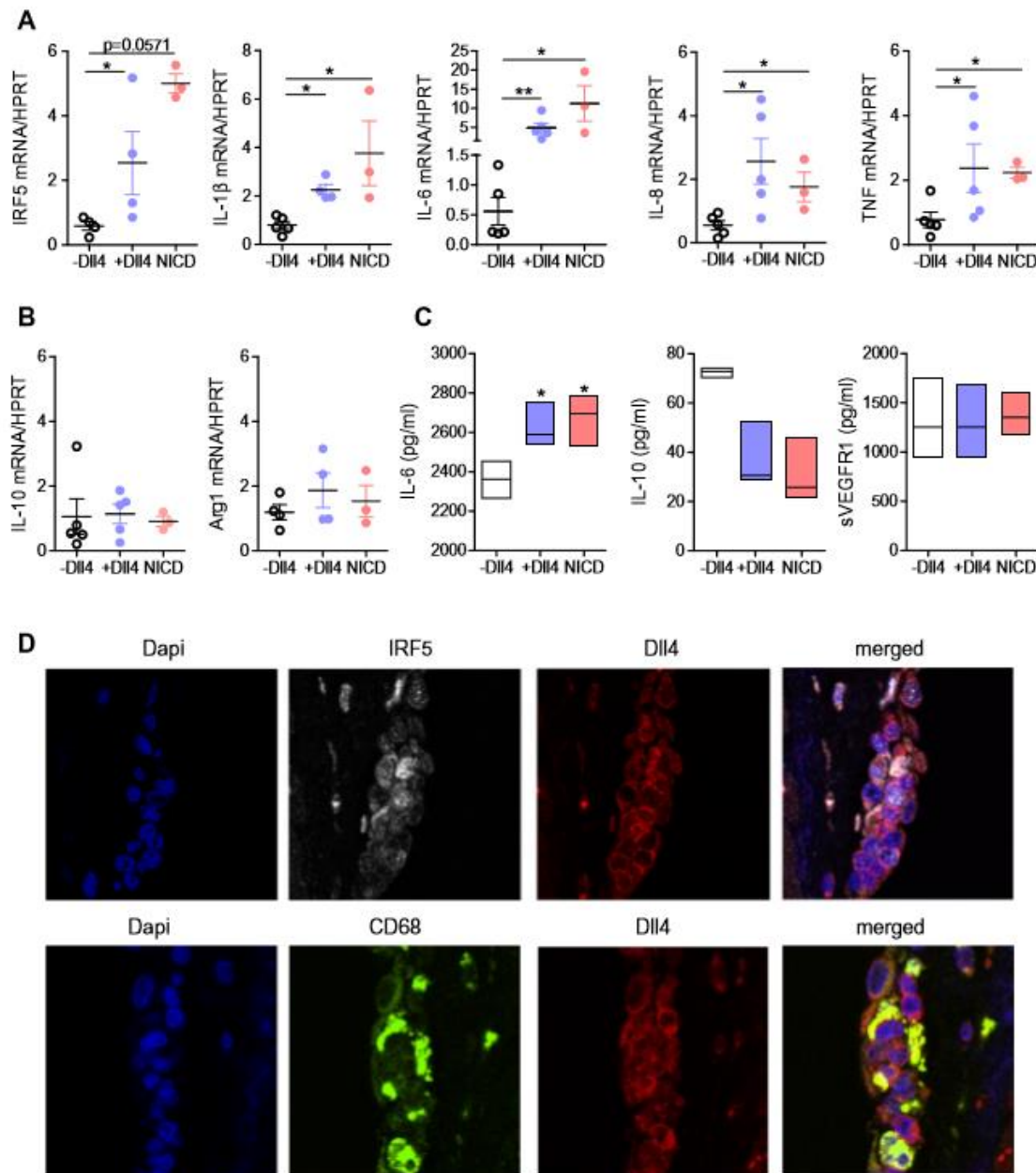


Fig. 6. Endothelial Dll4 drives pro-inflammatory cytokine production by monocytes. ECs were transduced with control (–Dll4), Dll4 (+Dll4) or NICD adenoviruses for 24 h and then cocultured with monocytes for 18 h. After cocultures, monocytes and culture supernatants were harvested for analysis (A, B) Quantification of transcripts for M1 (IRF5, IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF) and M2 (IL-10 and Arginase 1, Arg1) markers achieved by QRT-PCR. Data are expressed as relative expression calculated according to the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method, after normalization to HPRT-1 levels. Results shown are the mean $\pm$ SEM from at least three independent experiments performed in triplicate. (C) Box plots showing the levels of soluble IL-6, IL-10 and VEGF-R1 in culture supernatants were measured by ELISA. Results shown are representative of at least three independent experiments. Kruskal–Wallis test was used to statistically compare different conditions ($p < 0.05$; $^{**}p < 0.01$; $^{***}p < 0.001$ versus Ctrl (–Dll4)). (D) Coimmunostaining for IRF5 (white) and Dll4 (red) in EMB from cardiac transplants with AMR (upper panel). Coimmunostaining for CD68 (green) and Dll4 (red) in serial sections of EMB from cardiac transplants with AMR (lower panel). Nuclei are stained with DAPI (blue) and costainings are visualized as superimposition of images (merged), (magnification: $\times 600$).

macrophages (Fig. 6D). Collectively, these results identify endothelial Dll4-mediated Notch pathway as a key signaling pathway implicated in the differentiation of macrophages toward a, M1-like, pro-inflammatory phenotype that could contribute to microvascular inflammation upon AMR.

3.6. Evidence of a Dll4/IL-6 axis implicated in M1 polarization

The impact of Dll4 on pro-inflammatory cytokine production was further characterized. We found that endothelial Dll4 significantly increases IL-1 β , IL-6, IL-8 and TNF (Fig. 6A), but not IL-10,

transcript levels (5.40-, 2.90-, 2.70- and 2.20-fold increases versus Ctl, respectively) in macrophages (Fig. 6B). Similar results were obtained using either Dll4 or NICD transduction confirming that M1 polarization mediated by graft ECs is both Notch-dependent and Dll4-dependent. In parallel experiments, supernatants from co-cultures indicated that endothelial Dll4 and NICD significantly increased the release of the pro-inflammatory IL-6 and tightly decreased IL-10 production (Fig. 6C). In our conditions, Dll4 and NICD have no regulatory effect on VEGFR1 release (Fig. 6C). We speculate that IL-6 found in co-cultures play a role in Dll4-mediated M1 polarization. A set of experiments was conducted to decipher the respective contribution of Dll4 and IL-6 in macrophage differentiation. Incubation of monocytes with immobilized Dll4 and/or IL-6 (Fig. 7A and B) indicated that both are necessary to recapitulate M1 phenotype (CD64^{high}, CD200R^{low}, and CD11b^{low}). However, we found that while Dll4 represses the expression of M2 markers (CD200R and CD11b), IL-6, in contrast, increases the expression of M1 markers (CD64). Consequently, although IL-6 is at least partially, dependent on Dll4 in this model, Dll4 and IL-6 seem to cooperate probably by acting through specific independent pathways at the transcriptional level (Fig. 7A). In this context, we investigated the involvement of Notch canonical pathway in the Dll4-dependent regulation of M2 markers. To this aim, monocytes, incubated with immobilized Dll4, have been previously treated with or without a γ -secretase inhibitor (DAPT). We found that monocytes treated with DAPT almost restore the basal expression of CD11b ($78.65\% \pm 9.25\%$ without DAPT versus $87.15\% \pm 1.95\%$ with DAPT) and CD200R ($67.4\% \pm 19.4\%$ versus $80.35\% \pm 9.85\%$). Thus global decrease of M2 markers, in our conditions, occurred through Dll4 and canonical Notch signaling, dependent on γ -secretase activity. Further, in EC/macrophage cocultures the effect of Dll4 on macrophage M1 polarization was abrogated in Transwell experiments (Fig. 7C) supporting a contact-dependent effect. Blocking IL-6R on monocytes using blocking antibodies also partially prevents M1 polarization (Fig. 7D).

4. Discussion

This study shows the upregulation of the Notch ligand Dll4 and its spatial relationship with intravascular macrophage infiltrate upon AMR in cardiac transplants. We provide novel evidence of the importance of Dll4 in a functional crosstalk between graft ECs and blood monocytes leading to M1 macrophage polarization and local production of intravascular proinflammatory mediators and of the contribution of IL-6 in these processes.

Here we show that, in the heart, Dll4 expression in ECs is dramatically up regulated in response to inflammation and is co-expressed by both ECs and infiltrating macrophages. Consistent with this observation, in cultured ECs, TNF induces Dll4 in parallel to markers of EC activation such as VCAM-1. Thus our data propose Dll4 as a novel marker of EC activation. Consistent and complementary with our previous studies [16,17], the present findings report a qualitative switch in Notch receptor/ligand at EC surface. Indeed, concomitant and opposite changes in Notch4 and Dll4 levels were observed both in the grafts and in cell culture models. *In vitro* we demonstrated that overexpression of Dll4 inhibits the expression of Notch4 in EC cultures (Fig. 3C) supporting a direct regulatory effect. We interpreted these observations as a change in the Notch pattern that may affect the ability of endothelial cells to send (via Notch ligands) and to receive (via Notch receptors) Notch signals. This interpretation does not exclude a role for other Notch members. Thus, Dll4 may be not only a phenotypic marker but may also contribute to the regulatory functions of inflamed endothelium.

A significant decrease in the steady state transcript levels for Notch4 in transplants upon AMR and in activated EC cultures was observed. Visualization of Notch4 downregulation was difficult to achieve on transplant biopsies due to vascular injury and endothelial cell swelling in AMR that impair comparison with vessels in healthy tissues. Nevertheless, these findings are in concordance with our previous studies associating a downregulation of Notch4 with EC dysfunction [16] and with transplant arteriosclerosis in rodents [17]. Interestingly, immunostaining of transplant biopsies also revealed that Notch4 concentrates at the apical membrane of activated ECs, a location suitable to engage interactions with Notch ligands on contacting/adherent leucocytes from the blood stream. ECs are polarized and display distinct sets of membrane proteins on their apical versus basolateral surfaces [34]. Our study may indicate that Notch4 activity *in vivo* is compartmentalized in polarized ECs. This may imply an additive level of regulation for Notch signaling in polarized endothelium based on the spatial compartmentalization of specific receptors and ligands.

Functionally, Notch signaling seems to be sensitive to ligand over-expression [35]. High levels of Notch ligands can repress Notch activity in a cell-autonomous manner, *in cis*, a process called *cis*-inhibition [36,37]. Although no data are still available for Dll4 and Notch4, we can speculate that Dll4 overexpression in response to inflammation triggers *cis*-inhibition of Notch4 in ECs. Supportive of this concept, we present evidence that ectopic Dll4 expression downregulates Notch4 in ECs. Interaction of Notch with its ligands *in cis* may also inhibit signaling [38]. Here, we postulate that Dll4 overexpression in ECs results in Notch4 inhibition and reduced Notch signaling in ECs consistent with our earlier study showing that inflammation (i.e. TNF) impairs Notch activity in human EC cultures [16]. In other words, overexpression of Dll4 inhibits Notch signaling by making the signal-receiving cell refractory to the signal. On the other hand, Delta ligands are also able to provide Notch activation *on trans* by interacting with Notch receptor on neighboring cells [39]. Consequently, high Dll4 on ECs might theoretically activate Notch signaling in monocytes. This was supported by our experiments using coated Dll4 and DAPT demonstrating Notch activation in monocytes (Fig. 7A and B). Thus, endothelial Dll4 regulated by inflammation may engage a bidirectional regulation by inhibiting Notch activity in ECs (*cis* inhibition) and by activating (*trans* activation) Notch in monocytes. Dedicated experiments are required to confirm these regulatory processes and to identify the Notch receptor activated by endothelial Dll4 on monocytes.

The ability of macrophages to adopt functional phenotypes in response to pathogens or cytokines is well established. This led to the basic, but still debating, classification of M1 and M2 macrophages based on a panel of pro- and anti-inflammatory markers [40]. Previous data shed light on modulation of monocyte/macrophage survival [41], differentiation [42], activation [30] and more recently M1/M2 macrophage polarization [31,43] through the Notch signaling mediated by Delta ligands. M2-like macrophages have a lower level of Notch pathway while forced activation of Notch signaling increased M1 macrophages [43].

Our study demonstrated that a major impact of Dll4 expressed on ECs is the ability to elicit macrophage differentiation toward a pro-inflammatory phenotype. Dll4-induced macrophages express significantly higher levels of CD64, CD40, IL-1 β , IL-6, IL-8 and TNF but remain almost negative for the costimulatory molecules CD80 and CD86 and produce no soluble VEGFR1. Dll4-induced macrophages also express high transcript levels for the M1-type transcription factor IRF5 while Arginase-1 transcripts were found unchanged. In addition to promoting M1 gene expression, Dll4 suppresses expression of some typical markers of M2 macrophages including CD200R, CD11b and HLA-DR. Functionally, they produce a lower rate of IL-10. Overall, these phenotypic changes are compatible with a M1 population [32,40]. The persistence of low levels

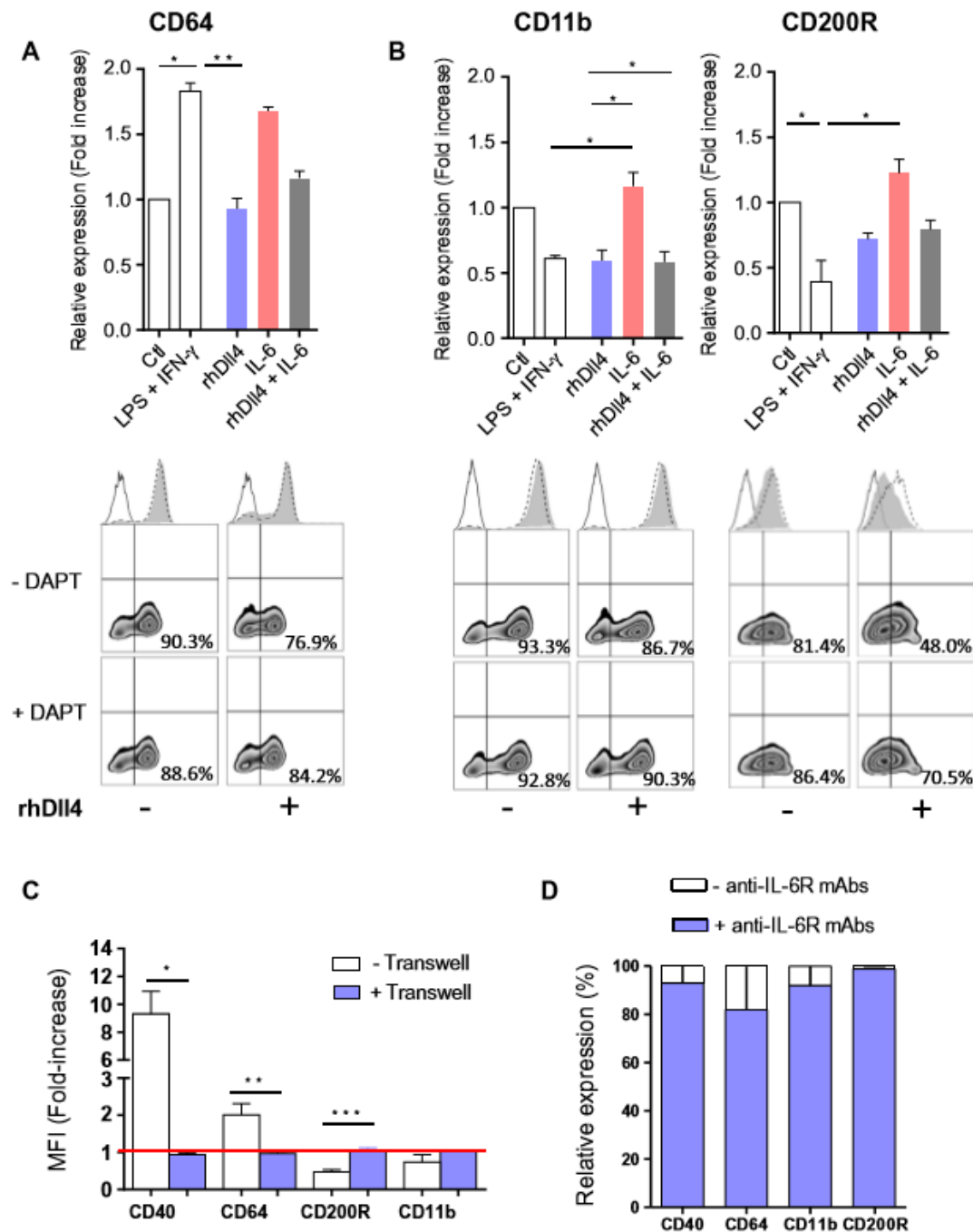


Fig. 7. Endothelial Dll4 and IL-6 cooperate to polarize M1 macrophages. Monocytes were incubated with coated BSA (Ctl), LPS + IFN- γ , immobilized human recombinant Dll4-Fc protein (rhDll4), recombinant human IL-6 or with a combination of rhDll4 and IL-6 for 18 h. Expression of CD64 (A), CD11b and CD200R (B) at cell surface was assessed by flow cytometry. Results are the mean $\pm$ SEM from five independent experiments (upper panel). Notch dependent or independent regulations of CD64, CD11b and CD200R were assessed by inhibition of Notch signaling (DAPT, 10 μ M). Results are shown as population frequency (dot plots) of monocytes incubated with or without coated rhDll4 and treated or not with the γ -secretase inhibitor. Representative histograms of cell surface expression of CD64, CD11b and CD200R show DAPT treated (dashed) or untreated (gray) monocytes (lower panel). (C, D) ECs were transduced with control (-Dll4), Dll4 (+Dll4) adenoviruses for 24 h and then cocultured with monocytes for 18 h in the presence of Transwell membranes (C) or in the presence of blocking anti-IL-6R mAbs (D). Flow cytometry to determine the relative expression of CD64, CD40, CD11b and CD200R on macrophages. Results shown are representative of at least 3 experiments and expressed as fold-increase compared to control (Dll4-ECs, C) or to cocultures with Dll4 + ECs in the absence of anti-IL-6R mAbs (D) ($p < 0.05$).

of M2 markers might be a feature of a transition step or, alternatively, of intravascular differentiated macrophages that remain to be characterized.

Endothelial Dll4 also triggers the selective and exclusive upregulation of the Dll4 ligand on macrophages. Thus, Dll4 associates with a pro-inflammatory phenotype on both ECs and macrophages and we propose Dll4 as a novel marker of M1 macrophages. A functional consequence of Dll4 expression on ECs is the release in endothelial/monocyte cocultures of the proinflammatory cytokines IL-1 β , IL-6, IL-8 and TNF. Among them IL-6 was found equally regulated by Dll4 and NICD, consistent with our recent data establishing an ADAM10-dependent and Notch-dependent regulation for IL-6 in vascular ECs [18]. Here we provide further evidence of a Dll4/IL-6 axis implicated in macrophage differentiation and we noted that both are necessary to shape a M1 phenotype. Dll4 down regulates M2 markers (HLA-DR, CD11b and CD200R) while IL-6 upregulates the M1 markers (CD40, CD64). Although several recent studies reported on the implication of Notch [30,43], Dll4 [31] or IL-6 [44] on macrophage differentiation, our study is the first to propose a complementary cooperative action for Dll4 and IL-6 in M1 differentiation. Our data suggest that the regulatory effects of Dll4 on M2 markers and IL-6 on M1 markers are both Notch-dependent.

Overall our work also highlights the contribution of M1 macrophages to vascular inflammation in AMR. The contribution of macrophage subsets to progression of kidney disease [45] and kidney transplant rejection is uprising [46] but almost unexplored in heart transplantation. The relative importance of each specific macrophage population in injury and repair processes and the identity of specific mediators will require further study.

Finally, deciphering the contribution of Dll4 and IL-6 in cardiac transplant rejection could support the concept that dedicated therapies targeting Notch may be promising in cardiac transplantation as recently suggested in a mouse model [47].

Disclosure

The authors of this manuscript have no conflicts of interest to disclose.

Acknowledgments

The authors thank Stéphanie Blandin and Cécile Deleine for immunohistological studies (MicroMorph core facility, Nantes, France). We thank also Delphine Coulais and Anne-Claire Branchu from DTC core-facility, CICBT0503, Nantes. We thank the vector core of the University Hospital of Nantes (INSERM UMR1087 Gene Therapy Laboratory, Nantes, France) supported by the Association Française contre les Myopathies (AFM) for providing the adenoviral vectors. This work was performed in the context of the IHU-Cesti, LabEx IGO and LabEx Transplantex projects which received French government financial support managed by the National Research Agency (ANR) via the "Investment Into The Future" programs ANR-10-IBHU-005, ANR-11-LABX-0016-01 and ANR-11-LABX-0070. The IHU-Cesti project is also supported by Nantes Metropole and the Pays de la Loire Region. This study is also supported by the "Fondation Centaure" (RTRS) which supports a French transplantation research network. A.P. was supported by a fellowship from the "Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche".

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2016.01.016>.

References

- [1] G.J. Berry, A. Angelini, M.M. Burke, P. Bruneval, M.C. Fishbein, E. Hammond, et al., The ISHLT working formulation for pathologic diagnosis of antibody-mediated rejection in heart transplantation: evolution and current status (2005–2011), *J. Heart Lung Transplant.* 30 (2011) 601–611.
- [2] J. Kobashigawa, M.G. Crespo-Leiro, S.M. Ensminger, H. Reichenspurner, A. Angelini, G. Berry, et al., Report from a consensus conference on antibody-mediated rejection in heart transplantation, *J. Heart Lung Transplant.* 30 (2011) 252–269.
- [3] M.D. Stegall, M.F. Chedid, L.D. Cornell, The role of complement in antibody-mediated rejection in kidney transplantation, *Nat. Rev. Nephrol.* 8 (2012) 670–678.
- [4] G. Matsumiya, S.R. Gundry, S. Nehisen-Cannarella, O.R. Fagoaga, T. Morimoto, S. Arai, et al., Serum interleukin-6 level after cardiac xenotransplantation in primates, *Transplant. Proc.* 29 (1997) 916–919.
- [5] Y. Liang, K. Christopher, P.W. Finn, Y.L. Colson, D.J. Perkins, Graft produced interleukin-6 functions as a danger signal and promotes rejection after transplantation, *Transplantation* 84 (2007) 771–777.
- [6] D.A. Rao, R.E. Eid, L. Qin, T. Yi, N.C. Kirkles-Smith, G. Tellides, et al., Interleukin (IL)-1 promotes allogeneic T cell intimal infiltration and IL-17 production in a model of human artery rejection, *J. Exp. Med.* 205 (2008) 3145–3158.
- [7] G.J. Berry, M.M. Burke, C. Andersen, P. Bruneval, M. Fedrigo, M.C. Fishbein, et al., The 2013 International Society for Heart and Lung Transplantation Working Formulation for the standardization of nomenclature in the pathologic diagnosis of antibody-mediated rejection in heart transplantation, *J. Heart Lung Transplant.* 32 (2013) 1147–1162.
- [8] T. Gridley, Notch signaling in vascular development and physiology, *Development* 134 (2007) 2709–2718.
- [9] S. Artavanis-Tsakonas, M.D. Rand, R.J. Lake, Notch signaling: cell fate control and signal integration in development, *Science* 284 (1999) 770–776.
- [10] T. Iso, L. Kedes, Y. Hamamori, HES and HERP families: multiple effectors of the Notch signaling pathway, *J. Cell. Physiol.* 194 (2003) 237–255.
- [11] S.M. Kwon, C. Alev, T. Asahara, The role of notch signaling in endothelial progenitor cell biology, *Trends Cardiovasc. Med.* 19 (2009) 170–173.
- [12] J.D. Leslie, L. Ariza-McNaughton, A.L. Bermange, R. McAdow, S.L. Johnson, J. Lewis, Endothelial signalling by the Notch ligand Delta-like 4 restricts angiogenesis, *Development* 134 (2007) 839–844.
- [13] F. Radtke, H.R. MacDonald, F. Tacchini-Cottier, Regulation of innate and adaptive immunity by Notch, *Nat. Rev. Immunol.* 13 (2013) 427–437.
- [14] J. Chung, I. Maillard, Notch signaling in alloreactive T cell immunity, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 360 (2012) 135–150.
- [15] T. Quillard, J. Devalliere, M. Chatelais, F. Coulon, C. Seveno, M. Romagnoli, et al., Notch2 signaling sensitizes endothelial cells to apoptosis by negatively regulating the key protective molecule survivin, *PLoS ONE* 4 (2009) e8244.
- [16] T. Quillard, J. Devalliere, S. Coupel, B. Charreau, Inflammation dysregulates Notch signaling in endothelial cells: implication of Notch2 and Notch4 to endothelial dysfunction, *Biochem. Pharmacol.* 80 (2010) 2032–2041.
- [17] T. Quillard, S. Coupel, F. Coulon, J. Fitau, M. Chatelais, M.C. Cuturi, et al., Impaired Notch4 activity elicits endothelial cell activation and apoptosis: implication for transplant arteriosclerosis, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 28 (2008) 2258–2265.
- [18] A. Pabois, J. Devalliere, T. Quillard, F. Coulon, N. Gerard, C. Labois, et al., The disintegrin and metalloproteinase ADAM10 mediates a canonical Notch-dependent regulation of IL-6 through Dll4 in human endothelial cells, *Biochem. Pharmacol.* 91 (4) (2014) 510–521.
- [19] E. Monsalve, M.A. Perez, A. Rubio, M.J. Ruiz-Hidalgo, V. Baladron, J.J. Garcia-Ramirez, 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.* 176 (2006) 5362–5373.
- [20] H. Xu, J. Zhu, S. Smith, J. Foldi, B. Zhao, A.Y. Chung, et al., Notch-RBP-J signaling regulates the transcription factor IRF8 to promote inflammatory macrophage polarization, *Nat. Immunol.* 13 (2012) 642–650.
- [21] S. Coupel, A. Moreau, M. Hamidou, V. Horejsi, J.P. Souillou, B. Charreau, Expression and release of soluble HLA-E is an immunoregulatory feature of endothelial cell activation, *Blood* 109 (2007) 2806–2814.
- [22] J. Schindelin, I. Arganda-Carreras, E. Frise, V. Kaynig, M. Longair, T. Pietzsch, et al., Fiji: an open-source platform for biological-image analysis, *Nat. Methods* 9 (2012) 676–682.
- [23] R. Khokha, A. Murthy, A. Weiss, Metalloproteinases and their natural inhibitors in inflammation and immunity, *Nat. Rev. Immunol.* 13 (2013) 649–665.
- [24] D. Drey Mueller, C. Martin, T. Kogel, J. Pruessmeyer, F.M. Hess, K. Horiuchi, et al., Lung endothelial ADAM17 regulates the acute inflammatory response to lipopolysaccharide, *EMBO Mol. Med.* 4 (2012) 412–423.
- [25] H. Uyttendaele, G. Marazzi, G. Wu, Q. Yan, D. Sassoon, J. Kitajewski, Notch4/int-3, a mammary proto-oncogene, is an endothelial cell-specific mammalian Notch gene, *Development* 122 (1996) 2251–2259.
- [26] T. Yoneya, T. Tahara, K. Nagao, Y. Yamada, T. Yamamoto, M. Osawa, et al., Molecular cloning of delta-4, a new mouse and human Notch ligand, *J. Biochem.* 129 (2001) 27–34.
- [27] M.A. Schaller, R. Neupane, B.D. Rudd, S.L. Kunkel, L.E. Kallal, P. Lincoln, et al., Notch ligand Delta-like 4 regulates disease pathogenesis during respiratory viral infections by modulating Th2 cytokines, *J. Exp. Med.* 204 (2007) 2925–2934.

- [28] S. Burghardt, A. Erhardt, B. Claass, S. Huber, G. Adler, T. Jacobs, et al., Hepatocytes contribute to immune regulation in the liver by activation of the Notch signaling pathway in T cells, *J. Immunol.* 191 (2013) 5574–5582.
- [29] M.E. Gentle, A. Rose, L. Bugeon, M.J. Dallman, Noncanonical Notch signaling modulates cytokine responses of dendritic cells to inflammatory stimuli, *J. Immunol.* 189 (2012) 1274–1284.
- [30] E. Fung, S.M. Tang, J.P. Canner, K. Morishige, J.F. Arboleda-Velasquez, A.A. Cardoso, et al., Delta-like 4 induces notch signaling in macrophages: implications for inflammation, *Circulation* 115 (2007) 2948–2956.
- [31] D. Fukuda, E. Aikawa, F.K. Swirski, T.J. Novobrantseva, V. Kotlianski, C.Z. Gorgun, et al., Notch ligand Delta-like 4 blockade attenuates atherosclerosis and metabolic disorders, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109 (2012) E1868–E1877.
- [32] A. Mantovani, M. Locati, Orchestration of macrophage polarization, *Blood* 114 (2009) 3135–3136.
- [33] T. Krausgruber, K. Blazek, T. Smallie, S. Alzabin, H. Lockstone, N. Sahgal, et al., IRF5 promotes inflammatory macrophage polarization and TH1–TH17 responses, *Nat. Immunol.* 12 (2011) 231–238.
- [34] C.O. Lizama, A.C. Zovein, Polarizing pathways: balancing endothelial polarity, permeability, and lumen formation, *Exp. Cell Res.* 319 (2013) 1247–1254.
- [35] D. del Alamo, H. Rouault, F. Schweisguth, Mechanism and significance of cis-inhibition in Notch signalling, *Curr. Biol.* 21 (2011) R40–R47.
- [36] M. Glittenberg, C. Pitsouli, C. Garvey, C. Delidakis, S. Bray, Role of conserved intracellular motifs in Serrate signalling, cis-inhibition and endocytosis, *EMBO J.* 25 (2006) 4697–4706.
- [37] H. Sheldon, E. Heikamp, H. Turley, R. Dragovic, P. Thomas, C.E. Oon, et al., New mechanism for Notch signaling to endothelium at a distance by Delta-like 4 incorporation into exosomes, *Blood* 116 (2010) 2385–2394.
- [38] T.L. Jacobsen, K. Brennan, A.M. Arias, M.A. Muskavitch, Cis-interactions between Delta and Notch modulate neurogenic signalling in *Drosophila*, *Development* 125 (1998) 4531–4540.
- [39] D. Sprinzak, A. Lakhnjal, L. Lebon, L.A. Santat, M.E. Fontes, G.A. Anderson, et al., Cis-interactions between Notch and Delta generate mutually exclusive signalling states, *Nature* 465 (2010) 86–90.
- [40] P.J. Murray, J.E. Allen, S.K. Biswas, E.A. Fisher, D.W. Gilroy, S. Goerdt, et al., Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines, *Immunity* 41 (2014) 14–20.
- [41] K. Ohishi, B. Varnum-Finney, D. Flowers, C. Anasetti, D. Myerson, L.D. Bernstein, Monocytes express high amounts of Notch and undergo cytokine specific apoptosis following interaction with the Notch ligand, Delta-1, *Blood* 95 (2000) 2847–2854.
- [42] K. Ohishi, B. Varnum-Finney, R.E. Serda, C. Anasetti, L.D. Bernstein, The Notch ligand, Delta-1, inhibits the differentiation of monocytes into macrophages but permits their differentiation into dendritic cells, *Blood* 98 (2001) 1402–1407.
- [43] Y.C. Wang, F. He, F. Feng, X.W. Liu, G.Y. Dong, H.Y. Qin, et al., Notch signaling determines the M1 versus M2 polarization of macrophages in antitumor immune responses, *Cancer Res.* 70 (2010) 4840–4849.
- [44] J. Maurer, B. Chaurasia, J. Goldau, M.C. Vogt, J. Ruud, K.D. Nguyen, et al., Signaling by IL-6 promotes alternative activation of macrophages to limit endotoxemia and obesity-associated resistance to insulin, *Nat. Immunol.* 15 (2014) 423–430.
- [45] M. Lech, R. Grobmayr, M. Ryu, G. Lorenz, I. Hartter, S.R. Mulay, et al., Macrophage phenotype controls long-term AKI outcomes – kidney regeneration versus atrophy, *J. Am. Soc. Nephrol.* 25 (2014) 292–304.
- [46] D. Toki, W. Zhang, K.L. Hor, D. Liuwantara, S.I. Alexander, Z. Yi, et al., The role of macrophages in the development of human renal allograft fibrosis in the first year after transplantation, *Am. J. Transplant.* 14 (2014) 2126–2136.
- [47] S. Wood, J. Feng, J. Chung, V. Radojicic, A.R. Sandy-Sloat, A. Friedman, et al., Transient blockade of delta-like notch ligands prevents allograft rejection mediated by cellular and humoral mechanisms in a mouse model of heart transplantation, *J. Immunol.* 194 (2015) 2899–2908.

Résultats partie II

Dll4 : Un ligand contrôlant la polarisation en macrophage M2 et l'apoptose

Article n°2: DLL4: a death ligand controlling M2 macrophage differentiation and apoptosis

Sylvain Pagie, Nathalie Gérard et Béatrice Charreau

Article en préparation

Objectif :

Au cours de nos premiers travaux, nous avons mis en évidence l'implication du ligand Notch Dll4 au cours de la polarisation du macrophage dans un contexte de rejet aigu humoral de l'allogreffe cardiaque. Ainsi nous avons pu montrer que l'association de Dll4 et de l'IL-6 induit la polarisation du macrophage vers un profil inflammatoire de type M1 en régulant positivement, de façon directe et indirecte, l'expression de molécules spécifiques et caractéristiques du macrophage M1. Dans la même étude nous mettons en évidence que lors de la polarisation du macrophage M1, le ligand Dll4 est également responsable de la diminution de l'expression de marqueurs M2 tels que CD200R et CD11b (Pabois *et al.*, 2016). Ainsi, l'objectif de cette seconde étude a été d'investiguer le rôle du ligand Dll4 au cours de la polarisation du macrophage M0 en macrophage anti-inflammatoire M2. A ce jour, toutes les études concernant le ligand Dll4 et les macrophages se sont intéressés au rôle du ligand dans la biologie du macrophage M1 mais aucune, à notre connaissance ne s'est intéressée au rôle de Dll4 au cours de la polarisation du macrophage M2.

Résumé :

La voie de signalisation Notch joue un rôle essentiel dans de multiple processus de différents types cellulaires dont les cellules immunitaires. Dll4 est un ligand des récepteurs de la voie Notch dont l'expression a été montrée comme restreinte aux cellules endothéliales, myéloïdes/dendritiques et les macrophages. L'activation de la voie Notch médiée par le ligand Dll4 participe aux mécanismes de l'angiogenèse, de l'inflammation et à la

différenciation Th17/Th2 des lymphocytes T. Nous avons précédemment mis en évidence que l'activation de la voie de signalisation Notch dans les monocytes, induite par l'expression de DLL4 à la surface des cellules endothéliales, contribue à la différenciation du monocyte en macrophage et à l'acquisition d'un phénotype pro-inflammatoire M1. L'étude présentée ici, poursuit la caractérisation du rôle de DLL4 dans la différenciation des macrophages par l'analyse de la capacité du ligand à interférer avec la polarisation du macrophage M2. L'impact de DLL4 au cours de la polarisation M2 a été analysé *in vitro* au cours de la différenciation et la polarisation de monocytes induite par du LPS et de l'IFN γ ou de l'IL-4 en présence ou non de la protéine recombinante DLL4 immobilisée. De cette manière, nous mettons en évidence que le ligand DLL4 altère spécifiquement la polarisation du macrophage M2 induite par l'IL-4 *via* l'inhibition significative de marqueurs du phénotype M2 tels que CD11b, CD206 et CD200R. Aucun impact n'a été détecté sur l'expression des marqueurs M1. DLL4 entraîne également une apoptose dépendante de la caspase3/7 spécifiquement au cours de la polarisation en macrophage M2. A la différence de DLL4, le ligand DLL1 n'entraîne aucun effet pro-apoptotique. Nous mettons en évidence que la signalisation DLL4 est médiée par le récepteur Notch1 et que l'inhibition des γ -secretases, qui bloquent de façon efficace la signalisation Notch, abroge l'apoptose médiée par DLL4. Les macrophages M2 ayant subi une polarisation complète présentent une résistance à l'action du ligand DLL4. DLL4 entraîne un changement dans l'expression de gènes affectant le profil Notch, module les fonctions du macrophages (TNF, IL-1 β , IL-6, IL-10 et CD40) et agit sur les gènes de la transcription et de la signalisation (IRF5, STAT5, c-Myc et SOCS3). En conclusion, nos recherches montrent une interaction entre la voie de signalisation DLL4/Notch et la voie de signalisation induite par l'IL-4/IL-4R entraînant le blocage de la polarisation en macrophage M2 à travers le contrôle de l'expression de gènes et l'induction de l'apoptose. L'apoptose des macrophages M2 induite par DLL4 peut refléter un processus naturel de sélection négative, et pourrait offrir une nouvelle voie permettant de manipuler les sous populations de macrophages dans un contexte clinique.

The Notch ligand DLL4 is a death ligand controlling M2 macrophage differentiation and inducing apoptosis

Pagie Sylvain, Gérard Nathalie and Charreau Béatrice

INSERM, UMR1064, LabEx Transplantex, and *IHU-CESTI, Nantes, F44000 France; # CHU Nantes, Institut de Transplantation et de Recherche en Transplantation–Urologie-Néphrologie, ITUN; §LUNAM Université de Nantes, Faculté de Médecine, Nantes, F44000 France.

Running title: DLL4 impairs M2 macrophage differentiation

Corresponding author:

Dr. Béatrice Charreau, PhD

INSERM UMR1064, 30 bd J. Monnet, 44093 Nantes cedex 01, France.

Phone: +33 2 40 08 74 16 ; Fax : +33 2 40 08 74 11

Email: Beatrice.Charreau@univ-nantes.fr

Abbreviations

CBF1: C promoter Binding Factor 1

DAPT: N-[N-(3,5-Difluorophenacetyl)-L-alanyl]-Sphenylglycine t-butyl ester

Dll: Delta-like

Hes: hairy enhancer of split

Hey: hairy related enhancer of split

IRF: Interferon regulatory factor

Jag: jagged

KLF: Krüppel-like factor

NF-κB: nuclear factor-κB

NICD: Notch intracellular domain

STAT: signal transducer and activator of transcription

TLR: toll like receptor

Abstract

Notch has an essential role in specifying cell fate at multiple stages in a broad array of cell types including immune cells. DLL4 is a Notch ligand with a restricted pattern of cellular expression and is found expressed by both endothelial and myeloid/dendritic cells and macrophages. DLL4-mediated Notch activation participates to angiogenesis, inflammation and T lymphocyte Th17/Th2 differentiation. We previously reported that the Notch activation in blood monocytes triggered by endothelial DLL4 contribute to the acquisition of pro-inflammatory M1 macrophage phenotype. The present study investigated further the contribution of DLL4 to human macrophage differentiation by analyzing the ability of DLL4 to interfere with M2 polarization. The effect of DLL4 was analyzed by performing *in vitro* macrophage differentiation of purified blood monocytes with either LPS plus IFN γ or IL-4 in the presence of recombinant human DLL4 immobilized on culture plates. As a result, we found that DLL4 triggers a specific alteration of the M2a phenotype leading to a significant inhibition of the M2 markers CD11b, CD206 and CD200R in response to IL-4. No change was observed for M1 markers. DLL4 also induces a caspase3/7-dependent apoptosis specifically in M2 differentiating macrophages. In contrast to DLL4, DLL1 had no pro-apoptotic effect. DLL4 signals *via* Notch1 and inhibition of γ -secretase, that efficiently blocks the Notch signaling, abrogates DLL4-mediated apoptosis. Fully differentiated M2 macrophages became resistant to DLL4 action. DLL4 triggers changes in gene expression affecting the Notch pattern, modulating the functions of macrophage subsets (TNF, IL-1 β , IL-6, IL-10 and CD40) and acting on gene transcription and signaling (IRF5, STAT1, c-Myc and SOCS3). In conclusion, our findings reveal an interplay between DLL4/Notch signaling and IL-4/IL-4R pathways impairing M2 differentiation through the control of gene expression and apoptosis. M2 apoptosis by DLL4, that may reflect a natural negative selection process, could provide a new way to manipulate macrophage subsets in clinical setting.

Introduction

Macrophages are key players of innate immunity and play a central role in inflammation and host defense against pathogens. Macrophages also contribute to tissue homeostasis and participate to tissue repair and metabolic functions. Diversity and plasticity are features of the monocyte/macrophage lineage that may acquire specific functional phenotypes according to environmental cues [1-3]. Mirroring the Th1/Th2 classification of T cells, macrophages may undergo either classical M1 or alternate M2 activation. Beside this classification, macrophages can adopt a spectrum of activation states ranging from M1 to various alternatively activated M2 macrophages depending on the nature of stimuli in the environment [1]. M1 macrophages express high level of proinflammatory cytokines and reactive oxygen species. M1 promote Th1 responses and have a strong activity against bacteria and tumor. M2 macrophages have immunoregulatory properties and roles in parasite control, tissue remodeling and tumor progression. Changes in the balance of macrophage activation are associated with several pathological conditions [4]. M1 macrophages are involved in the initiation and persistence of inflammatory disorders while M2 associated with resolution or chronicity of low grade inflammation but also with tumor progression. The molecular bases of macrophage polarization are complex and include transcription factors, signaling pathways, epigenetic and posttranscriptional regulations. Depending on the initiating stimuli, a balance between STAT1 and STAT3/6 regulates M1 *versus* M2 polarization discriminating inflammatory and immunosuppressive functions. The nuclear factor- κ B (NF- κ B) and STAT1 are involved into M1 activation into cytotoxic and inflammatory cells. In contrast, the immunosuppressive and pro-tumor activities of M2 result from STAT3 and STAT6 activation. Krüppel-like factor (KLF) 4 cooperates with STAT to induce M2 and inhibit M1 genes, respectively. KLF2 also inhibit NF- κ B activity. Macrophage differentiation is a dynamic process and macrophages can switch from a phenotype to another in response to requirements [5,6].

Notch signaling is known to modulate *macrophage* polarization. Notch has an essential role in specifying cell fate at multiple stages in a broad array of cell types [7]

including immune cells [8,9]. The mammalian family of Notch proteins includes four receptors (Notch1–4) and a set of ligands comprising Jagged (Jag1 and 2) and Delta-like members (Dll1, 3, and 4). Notch receptors and ligands are transmembrane proteins with extracellular domains required for juxtacrine ligand-receptor interactions. This cell-to-cell interaction induces a sequence of proteolytic cleavages of the receptor, mediated by proteases including γ -secretase, which results in the release of the Notch intracellular domain (NICD) into the nucleus. In canonical Notch pathway activation, nuclear NICD binds the RBP-J DNA-binding protein (also known as CSL or CBF1) to form a transcriptional activator through the recruitment of coactivator proteins [10]. Alternative mechanisms of Notch signaling (i.e. non canonical), RBP-J-independent, have been described [10]. Forced activation of Notch signaling increased M1 macrophages while macrophages deficient in canonical Notch signaling showed M2 phenotypes [11]. Macrophage expression of Notch receptors (such as Notch1) and ligands, and the activation of canonical Notch signaling contribute to M1 gene expression and cytokine production [12-14]. NICD also interacts with HIF-1 α and increases glycolytic activity involved in M1 activation [15]. Notch activation can be initiated in macrophages by toll like receptor (TLR) activation [14,16]. Nevertheless, whether the Notch pathway plays a regulatory control in M2 macrophage polarization remains almost unknown.

Dll4 is the only Notch ligand with a restricted pattern of cellular expression and is found expressed by both endothelial and myeloid/macrophages cells [17,18]. Dll4 also exhibit specific affinity compared to jag1 and Dll1 and is involved in endothelial/macrophage interactions during angiogenesis [19-21]. Our previous study has indicated that the Notch activation in monocytes triggered *via* endothelial Dll4, in conjunction with IL-6, mostly promotes the M1 gene expression and phenotype [22]. The present study focused further on the contribution of Dll4 to macrophage differentiation by analyzing the ability of Dll4 to interfere with M2 polarization. Our findings revealed that Dll4 drives a Notch-dependent selection process by preventing M2 differentiation and by inducing caspase-dependent M2-specific apoptosis.

Material and Methods

Reagents and antibodies

Recombinant human Dll4-Fc (rhDll4) and Dll1-Fc (rhDll1) proteins were purchased from R&D Systems (R&D Systems Europe Ltd, Abingdon, UK) and were diluted into PBS (5 µg/mL) for coating onto tissue culture plates for 4h. Pharmacological inhibitors of γ -secretase (N-[N-(3,5-Difluorophenacetyl)-L-alanyl]-Sphenylglycine t butyl ester; DAPT, Sigma Aldrich, Lyon, France) and of JAK/STAT signaling (Ruxolitinib, Invivogen, Toulouse, France) were used at 0.5 µg/mL and 0.1 µg/mL, respectively. For the inhibition of γ -secretase, macrophages were incubated with DAPT (0.5 µg/mL; Sigma Aldrich) for the 48h during or for 24h following M1 or M2 differentiation. Similarly, inhibition of JAK/STAT signaling pathway was achieved by adding Ruxolitinib (0.1 µg/mL; Invivogen) during the differentiation step. Macrophage Colony Stimulating Factor (M-CSF), IL-4 and IL-10 were from R&D Systems.

Purification of human monocytes, differentiation and polarization protocols

Monocytes (CD14+) were obtained from blood of healthy donor volunteer from the Etablissement Français du Sang (EFS-Pays de la Loire, Nantes, France). PBMC fraction was isolated by standard Ficoll isolation techniques *and* then CD14+ monocytes were purified by counterflow centrifugal elutriation with a minimal purity of $\geq 87\%$ by the DTC-core-facility (CIC BT0503, Nantes, France). For differentiation, purified monocytes were grown in RPMI1640 medium supplemented with 20% Fetal Bovine Serum, Glutamine, 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, 1X non-essential amino acid (Life Technologies, Cergy-Pontoise, France), 1 mM sodium pyruvate (Life Technologies) and M-CSF (100 ng/mL, R&D systems) for 7 days on 9cm² dishes (1.10^6 cells/cm²) to differentiate into M0 macrophages. For M1/M2 polarization, M0 macrophages (2.5×10^5 cells/cm²) were then cultured for an additional 48h time period in RPMI supplemented with 10% FBS and IFN- γ (100U/mL; Imukin, Boehringer, Ingelheim, Germany) plus LPS (100 ng/mL; Sigma Aldrich) (classical stimulation for M1 differentiation) or with either IL-4 (20 ng/mL; R&D systems) or IL-10 (20 ng/mL; R&D systems) (alternative stimulation for M2a and M2c differentiation, respectively).

Messenger RNA and Quantitative RT-PCR

Total RNA were isolated using Trizol reagent (Life Technologies), phenol-chloroform extraction and isopropanol precipitation. RNA were analyzed using a microchip capillary electrophoresis system Caliper LabChip GX (PerkinElmer, USA). RNA with RQS >7 (RNA Quality Score) were treated with ribonuclease-free Turbo-DNase (Life Technologies) before reverse transcription (RT). RTs were performed with Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Life Technologies) according to the manufacturer's instructions. Real-time quantitative PCR was performed in a ViiA™ 7 sequence detection application program using labeled TaqMan probes (Life Technologies). β actin (Actb) (Hs99999903_m1) was used as an endogenous control to normalize for variations in the starting amount of RNA. For the others transcripts, the following ready-to-use primers/probe mixes were used (Life Technologies): Notch1 (Hs01062014_m1), Notch2 (Hs01050702_m1), Notch3 (Hs01128541_m1), Notch4 (Hs00270200_m1), Dll1 (Hs00194509_m1), Dll3 (Hs00213561_m1), Dll4 (Hs00184092_m1), Jag1 (Hs01070036_m1), Jag2 (Hs00171432_m1), Hes1 (Hs00172878_m1), Hey1 (Hs01114113_m1), NOS2 (Hs01075529_m1), IRF5 (Hs00158114_m1), STAT1 (Hs01013996_m1), SOCS3 (Hs02330328_s1), TNF (Hs01113624_g1), IL-6 (Hs00174131_m1), IL-1 β (Hs0155410_m1), CD40 (Hs00334176_m1), Arginase 1 (Hs00968979_m1), CD200R (Hs00793597_m1), IL-10 (Hs00961622_m1), IL-4 (Hs0017422_m1), c-myc (Hs00811069_g1). Gene expression was calculated according to the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method.

Phenotype and apoptosis analysis by flow cytometry

For direct immunofluorescence labeling, macrophages were stained with the following fluorescent anti-human mAbs: anti-CD40-FITC, anti-CD64-A700, anti-CD80-V450 and anti-CD86-APC, anti-CD11b-pacific blue, anti-CD163-PE, anti-CD206-FITC (all from BD Biosciences, San Diego, CA) and anti-CD200R-APC (Abs Serotec, Oxford, UK). For Notch1 receptor analysis, macrophages were immunostained using rabbit anti-Notch1 (ab52627) Abs (1:100 dilution) and alexa-488 labelled anti-rabbit IgG. For apoptosis analysis, cells were incubated with Annexin V/IP following recommendations of the by the commercial protocol

(Life Technologies). Unstained cells and staining with irrelevant mAbs were used as negative controls. Fluorescence was measured by flow cytometry on FACS LSR II® (BD Biosciences) and analyzed using FlowJo® VX (Tree Star, Inc., Ashland, OR).

Apoptosis assays and caspase 3/7 activity

For apoptosis time-lapse experiment, 2.5×10^5 cells, pre-incubated with or without DAPT, were plated on coated rhDll4 or rhDll1 or no diluent on Ibidi μ -Slide 8 well (Ibidi, Nanterre, France). Then one drop of bead suspension of CellEvent®Caspase-3/7 Green (Molecular probes, Life technologies) is adding to the medium and supplemented or not with IL-4. Intracellular Caspase 3/7 activation measurement was performed at 37°C during 48h. Cells were illuminated every 10 minutes with a xenon lamp by using 480/520 nm excitation filter. Emission at 525/530 nm was used for analysis of caspase 3/7 activation and captured with a Cool Snap HQ2 camera (Roper, Tucson, AZ). Images were analyzed using Metamorph 7.5.6© software (Molecular Devices, Sunnyvale, USA).

Western blotting

Cells were lysed in RIPA buffer containing protease and phosphatase inhibitors (PIC cocktail, Sigma-Aldrich). Protein concentration was determined using BCA™ protein assay reagent (Pierce). Cell lysates were resolved by SDS-PAGE (10%), and proteins were transferred to nitrocellulose membranes (ECL Hybond; Amersham, Little Chalfont, UK) using a Trans-Blot SD semidry electrophoretic transfer cell (Bio-Rad, Marne-la-Coquette, France). Then, membranes were subjected to immunoblot analysis using the primary antibodies (anti-Notch1 from Abcam (ab52627; dilution 1:1000) and anti-GAPDH (sc-32233 dilution 1:1000) from Santa Cruz Biotechnology) and appropriate peroxidase-conjugated secondary antibodies. Antibody-bound proteins were detected using an enhanced chemiluminescence (ECL) kit (Amersham) and luminescent image analyzer LAS-4000 (Fujifilm, Tokyo, Japan).

Statistical analysis

All experiments were representative of at least 3 independent experiments. Data are expressed as mean $\pm$ SEM and compared using non-parametric Mann-Whitney test, Kruskal-Wallis test (with Dunn's multiple comparison post-test) if there more than two conditions. A p value <0.05 was considered statistically significantly different. In all figures one star (*) denotes $p < 0.05$, two stars (**) denotes $p < 0.01$ and three stars (***) denotes $p < 0.001$.

Results

DLL4 impairs M2 macrophage differentiation.

To investigate the interplay between Notch and macrophage phenotype, we collected and purified monocytes from healthy blood donors. We stimulated macrophages (M0) previously induced by M-CSF with either IFN γ plus LPS to promote formation of M1 macrophages (classical stimulation) or IL-4 to promote formation of M2 macrophages (alternative stimulation; M2a subtype) as previously described [23]. **Figure 1A** illustrates the phenotype that discriminate M1 and M2 macrophages 48h post-differentiation compared to M0 harvested at the end of M-CSF treatment. Phenotype changes featuring M1 compared to M0 include enhanced expression of 4 M1 typical markers: CD40, CD64, CD80, and CD86. In contrast, as expected, LPS plus IFN γ induced no changes in M2 markers. Conversely, differentiation in presence of IL-4 induced significant increase in 3 out of 4 M2 markers (CD11b, CD200R and CD206). IL-4 induced no change in M1 markers. Overall, in our conditions differentiated M1 are CD40^{high}, CD64^{high}, CD80^{high} CD86^{high} macrophages and M2a are CD11b^{high}, CD206^{high}, CD200R^{high} macrophages

Ectopic expression of ligands for Notch may lead to lateral activation (cis activation) of Notch in the transfected cells [24]. To exclude this, the effect of DLL4 was investigated by performing macrophage differentiation with either LPS+IFN γ or IL-4 in the presence of recombinant human DLL4 immobilized on culture plates. As a result, we found that DLL4 triggers a specific alteration of the M2a phenotype leading to a significant inhibition of the CD11b, CD206 and CD200R molecules that remain near baseline observed on M0 (**Figure 1B**). In contrast DLL4 did not impair the expression of these M2 markers basally expressed on M0 or on M1 differentiated cells. Moreover, when M1 polarization is performed in the presence of recombinant DLL4 no significant change was found in M1 phenotype. These data unveil that Notch signaling through DLL4 is a regulatory mechanism of macrophage differentiation that play an important role in preventing M2 polarization. These findings also support an inhibitory role for DLL4 and Notch signaling on the IL-4 signaling pathway.

Dll4 selectively triggers apoptosis of M2 macrophages.

Next, we sought to define whether Dll4 could induced macrophage apoptosis. To this aim, apoptosis was measured using annexin-V immunostaining and by the analysis of caspase-3/7 activity in live cells. We found that incubation with Dll4 during IL-4-mediated differentiation triggers a dramatic apoptosis of M2 cells leading to up to 92% of dead (IP⁺/AnnexinV⁺) cells compared to controls (**figure 2A and 2B**). In parallel experiments, M0 cells incubated with Dll4 during the polarization into M1 cells exhibited no change in cell viability. Interestingly, when IL-10 is used instead of IL-4 to induce M2c differentiation, Dll4 drives a similar apoptosis (**figure 2C**) supporting the idea that Dll4/Notch signal impair anti-apoptotic/pro-survival signals mediated by both IL-4 and IL-10 in differentiating macrophages.

Time course analysis of caspase-3/7 activity by videomicroscopy in live cells revealed that cell apoptosis started rapidly after incubation with IL-4 in the presence of Dll4 and reached a maximal level at 48h. We used this dynamic analysis to test whether the apoptotic effect was specific to Dll4 or could be achieved using another Notch ligand. To this aim experiments were repeated using recombinant Dll1 instead of Dll4. As shown in the **figure 3**, in contrast to Dll4, Dll1 had no effect on cell apoptosis. Moreover, in the presence of DAPT, an inhibitor of γ -secretase, that efficiently blocks the Notch signaling pathway, Dll4-mediated M2 apoptosis was abrogated indicating that Dll4 triggers M2 apoptosis *via* Notch signaling. Thus the regulatory control of M2 differentiation seems to be Dll4-specific and Notch-dependent and results in decreased M2 gene expression and apoptosis.

Interplay between Dll4/Notch and IL-4/IL-4R signals at the JAK/STAT level during the M2 differentiation process.

Next, we tested whether Dll4 may convey its action on fully differentiated M2 macrophages. Thus IL-4-induced M2 were incubated with Dll4 and the impact of Dll4 signaling on both M2 phenotype and apoptosis was measured. We found that Dll4 induces no change in M2 phenotype and was not able to induce apoptosis of fully differentiate M2

(Figure 4). This suggest that differentiated M2 macrophages became resistant to DLL4 action. These findings supports the hypothesis that DLL4/Notch signaling interfere with the IL-4/IL-4R signaling during the differentiation process. Supportive of this hypothesis, we further observed that inhibition of the JAK/STAT pathway, a common downstream signaling event to IL-4 and IL-10 as well as many pro-survival signals, significantly potentiates the apoptotic effect of DLL4 on M2 differentiating cells **(Figure 5)**. Indeed, ruxolitinib a pharmacological inhibitor of JAK/STAT efficiently prevent IL-4 signaling and M2 differentiation as attested by the abolition of M2 phenotype **(Figure 5A)**. Further, while ruxolitinib alone was not able to promote macrophage apoptosis, ruxolitinib strongly increase the percentage of apoptotic cells mediated by DLL4 in the presence of IL-4. These data provide a starting evidence for an interaction between DLL4/Notch and IL-4/IL-4R signals at the JAK/STAT level.

DLL4/Notch1 axis influences Notch profile and regulates signaling mediators upon M2 differentiation.

In an attempt to elucidate signaling events conducted by DLL4 during M2 differentiation, quantitative RT-PCR was conducted for 24 gene transcripts including Notch receptors, ligands and effectors, M1-type and M2-type transcripts **(Figure 6A)**. As a result we found that DLL4 influence M1 and M2 polarization by promoting increased mRNA for DLL4, Notch2 and Hey1 in M1 while increasing Notch1, jag1 and hes1 transcripts in M2 differentiating cells. Thus DLL4 shapes the Notch pattern of macrophages. DLL4 signaling has also consequences on mRNA steady state levels for a set of molecules such as TNF, IL-1b, IL-6, IL-10 and CD40 that determine the functions of macrophage subsets. Mechanistically, DLL4 strongly enhances IRF5 and STAT1, in both M1 and M2, and c-Myc and SOCS3 in M1.

The selective increase in Notch1 mRNA in M2 subsets, compared to M0 and M1, suggested that DLL4 may signal through Notch1 in these cells. To test this hypothesis, we analyzed the surface expression of Notch1 during the differentiation in the presence of DLL4. We observed that incubation with recombinant DLL4 during the differentiation process results in a strong decrease in Notch1 expression at cell surface in M2 while only a modest decrease was found in M1 **(Figure 6B)**. Considering that a decrease in Notch receptor may reflect its cleavage following ligand/receptor interaction and subsequent activation of Notch

signaling this data could suggest that Dll4 mediates Notch signaling in macrophages *via* Notch1 as previously reported [25]. Using antibodies directed against the intracellular domain of Notch1 (N1ICD) in Western blotting assays, we showed that Dll4 promote release of N1ICD in IL-4-induced but not in LPS+IFN γ treated macrophages (**Figure 6C**). Together, these results reveal that macrophage polarization into M1 or M2 coincides with global changes in Notch receptor/ligand expression further altered in the presence of Dll4 and reveal a specific signaling crosstalk between IL-4/IL-4R and the Dll4/Notch1 axis.

Discussion

Previous studies of the role of the Notch pathway in immune cell types have focused mainly on lymphocytes [9]. Nevertheless, Notch signaling can also influence myeloid cell differentiation and its expression and its role in the specification of macrophage subtype and function is emerging [11,26,27]. In seminal a study, Fung et al reported on the expression of multiple Notch receptors and ligands in human macrophages and have shown a marked increase in Dll4 expression induced in human primary macrophages by proinflammatory stimuli (LPS, IL-1 β , and LDL). This study also associated Dll4 to M1-type macrophages and showed the detection of immunoreactive Dll4 in human atherosclerotic plaques suggesting possible homotypic and heterotypic roles for Dll4 in activated macrophages [26]. Consistent with these data we recently reported increased Dll4 expression in both endothelial cells and macrophages during microvascular inflammation suggesting that Dll4 may be an activation marker that could play a role in inflammatory endothelial/macrophage interplay [22]. Forced activation of Notch signaling increased M1 macrophages which produce IL-12, no matter whether M1 or M2 inducers were applied. When Notch signaling was blocked, the M1 inducers induced M2 response in the expense of M1 [11]. Here we show, for the first time to our knowledge, that the Notch ligand Dll4 is a potent inhibitor of macrophage differentiation into M2-type macrophages. This effect results from both an inhibition of M2 gene expression and a selective induction of apoptosis.

As a first result, our study indicated that induction of M2 by IL-4 in the presence of immobilized recombinant Dll4 leads to a significant inhibition of M2 phenotype. Dll4 selectively prevent the upregulation of CD11b, CD200R and CD206 promoted by IL-4. In contrast Dll4 has no effect on M1 markers regulated by LPS and IFN γ . Likewise, the phenotype of M0 was found unchanged in the presence of Dll4 except a slight decrease for CD86. Our findings are thus consistent with previous data demonstrating in T cells that Dll4 signals to drive Th17 differentiation through the upregulation of ROR γ t while at the same time limiting Th2 cytokine production [28]. Together these data substantiate evidence for

DLL4 in orienting both innate and adaptive immune cells toward a proinflammatory phenotype also through a negative regulation of immunosuppressive cells and cytokines.

Furthermore, associated with the blockade of M2 phenotype, DLL4 induces the cell death of the vast majority of macrophages differentiating in the presence of IL-4. Apoptosis mediated by DLL4 is caspase-dependent and Notch-dependent. Apoptosis was obtained with DLL4 but not with DLL1. By being central in tissue homeostasis Notch controls to a fine-tuned balance between cellular proliferation, survival and apoptosis. Consequently, Notch activation has been shown to promote or inhibit apoptosis depending on cell type and environment [7,29-31]. For instance in T cells, Helbig and colleagues have shown that Notch controls the size of the CD4⁺T cell population, predominantly by protecting already expanded clones from apoptosis. This anti-apoptotic effect is efficiently mediated by recombinant DLL4 and to a lesser extent by DLL1 [32]. Notch also promotes expansion of CD8⁺ T cells, in part, by protecting these cells from cell death supporting the idea that Notch activation *via* DLL4-Fc has a general role in controlling the viability of activated T cells. An important point is the nature of the Notch receptor that convey DLL4 apoptotic signal in IL-4 induced M2 cells. According to the literature, Notch1 and Notch4 are the major ligands for DLL4 [33]. Together QPCR, facs analysis and Western blots mostly support the implication of a DLL4/Notch1 axis in the apoptosis of IL-4 treated macrophages with a possible involvement of *hes1* as effector. Interestingly, an interplay between DLL4 and Notch1 has been recently described in migrating epithelium where leader cells express high levels of DLL4 [25]. In this model, Notch1/DLL4 signaling provides an autoregulatory mechanism to maintain the density of leader cells during collective migration. If the density of DLL4-expressing leader cells is high, the Notch1 level in neighboring cells will be enhanced, in turn inhibiting DLL4 expression. Whether similar autoregulation may occur in an interplay between M1/M2 macrophages remains to be explored.

Accumulating evidence supports the existence of important but incompletely understood crosstalk between Notch and other signaling pathways such as MAPK, PI3K/Akt, and NF- κ B [34]. Our findings provide evidence for a crosstalk between IL-4/IL-4R signaling

and the Notch pathway mediated by Dll4. IL-4 signaling is well known and is initiated after receptor oligomerization which involves JAK1 and JAK3 [35]. This can be inhibited by SOCS-1. The induction of many genes by IL-4 involves activation of STAT6. Some of the target genes induced by STAT6 can be repressed by BCL-6. Thus it could be speculated that repressors such as SOCS1 and BCL-6 may be involved in the regulatory and pro-apoptotic interplay between Dll4/Notch and IL-4 signaling. The molecular mechanism of this crosstalk still needs investigations [36].

Manipulating macrophage subsets to cure cancer is an emerging therapeutic approach [37,38]. In parallel, the Notch pathway became an attractive therapeutic target and several tools (e.g., γ -secretase inhibitors, neutralizing antibodies against Dll4 or NOTCH1) that interfere with Notch signaling are currently being developed and tested in various murine cancer models or even in clinical trials [39-41]. Ultimately, our study still needs validation but yet propose to combine both approaches by using Dll4 as a new molecular target to control macrophage specification. Conversely, our findings may also suggest that some preclinical results obtained with anti-Dll4 therapies could also relied, in part, on macrophage alteration.

References

1. Mosser DM, Edwards JP (2008) Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* 8: 958-969.
2. Mantovani A, Locati M (2013) Tumor-associated macrophages as a paradigm of macrophage plasticity, diversity, and polarization: lessons and open questions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 33: 1478-1483.
3. Murray PJ, Allen JE, Biswas SK, Fisher EA, Gilroy DW, et al. (2014) Macrophage Activation and Polarization: Nomenclature and Experimental Guidelines. *Immunity* 41: 14-20.
4. Hasan D, Chalouhi N, Jabbour P, Hashimoto T (2012) Macrophage imbalance (M1 vs. M2) and upregulation of mast cells in wall of ruptured human cerebral aneurysms: preliminary results. *J Neuroinflammation* 9: 222.

5. Stout RD, Jiang C, Matta B, Tietzel I, Watkins SK, et al. (2005) Macrophages sequentially change their functional phenotype in response to changes in microenvironmental influences. *J Immunol* 175: 342-349.
6. Biswas SK, Mantovani A (2010) Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nat Immunol* 11: 889-896.
7. Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ (1999) Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* 284: 770-776.
8. Yuan JS, Kousis PC, Suliman S, Visan I, Guidos CJ (2010) Functions of notch signaling in the immune system: consensus and controversies. *Annu Rev Immunol* 28: 343-365.
9. Radtke F, MacDonald HR, Tacchini-Cottier F (2013) Regulation of innate and adaptive immunity by Notch. *Nat Rev Immunol* 13: 427-437.
10. Kopan R, Ilagan MX (2009) The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism. *Cell* 137: 216-233.
11. Wang YC, He F, Feng F, Liu XW, Dong GY, et al. (2010) Notch signaling determines the M1 versus M2 polarization of macrophages in antitumor immune responses. *Cancer Res* 70: 4840-4849.
12. Monsalve E, Perez MA, Rubio A, Ruiz-Hidalgo MJ, Baladron V, et al. (2006) Notch-1 up-regulation and signaling following macrophage activation modulates gene expression patterns known to affect antigen-presenting capacity and cytotoxic activity. *J Immunol* 176: 5362-5373.
13. Monsalve E, Ruiz-Garcia A, Baladron V, Ruiz-Hidalgo MJ, Sanchez-Solana B, et al. (2009) Notch1 upregulates LPS-induced macrophage activation by increasing NF-kappaB activity. *Eur J Immunol* 39: 2556-2570.
14. Palaga T, Buranaruk C, Rengpipat S, Fauq AH, Golde TE, et al. (2008) Notch signaling is activated by TLR stimulation and regulates macrophage functions. *Eur J Immunol* 38: 174-183.
15. Landor SK, Mutvei AP, Mamaeva V, Jin S, Busk M, et al. (2011) Hypo- and hyperactivated Notch signaling induce a glycolytic switch through distinct mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 18814-18819.
16. Xu J, Chi F, Guo T, Punj V, Lee WN, et al. (2015) NOTCH reprograms mitochondrial metabolism for proinflammatory macrophage activation. *J Clin Invest* 125: 1579-1590.
17. Shutter JR, Scully S, Fan W, Richards WG, Kitajewski J, et al. (2000) Dll4, a novel Notch ligand expressed in arterial endothelium. *Genes Dev* 14: 1313-1318.

18. Koga J, Nakano T, Dahlman JE, Figueiredo JL, Zhang H, et al. (2015) Macrophage Notch Ligand Delta-Like 4 Promotes Vein Graft Lesion Development: Implications for the Treatment of Vein Graft Failure. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 35: 2343-2353.
19. Gessler M (2009) Dll1 and Dll4: similar, but not the same. *Blood* 113: 5375-5376.
20. Benedito R, Roca C, Sorensen I, Adams S, Gossler A, et al. (2009) The notch ligands Dll4 and Jagged1 have opposing effects on angiogenesis. *Cell* 137: 1124-1135.
21. Mohtashami M, Shah DK, Nakase H, Kianizad K, Petrie HT, et al. (2010) Direct comparison of Dll1- and Dll4-mediated Notch activation levels shows differential lymphomyeloid lineage commitment outcomes. *J Immunol* 185: 867-876.
22. Pabois A, Pagie S, Gerard N, Labois C, Pattier S, et al. (2016) Notch signaling mediates crosstalk between endothelial cells and macrophages via Dll4 and IL6 in cardiac microvascular inflammation. *Biochem Pharmacol* 104: 95-107.
23. Zajac E, Schweighofer B, Kupriyanova TA, Juncker-Jensen A, Minder P, et al. (2013) Angiogenic capacity of M1- and M2-polarized macrophages is determined by the levels of TIMP-1 complexed with their secreted proMMP-9. *Blood* 122: 4054-4067.
24. Jacobsen TL, Brennan K, Arias AM, Muskavitch MA (1998) Cis-interactions between Delta and Notch modulate neurogenic signalling in *Drosophila*. *Development* 125: 4531-4540.
25. Riahi R, Sun J, Wang S, Long M, Zhang DD, et al. (2015) Notch1-Dll4 signalling and mechanical force regulate leader cell formation during collective cell migration. *Nat Commun* 6: 6556.
26. Fung E, Tang SM, Canner JP, Morishige K, Arboleda-Velasquez JF, et al. (2007) Delta-like 4 induces notch signaling in macrophages: implications for inflammation. *Circulation* 115: 2948-2956.
27. Fukuda D, Aikawa E, Swirski FK, Novobrantseva TI, Kotelianski V, et al. (2012) Notch ligand Delta-like 4 blockade attenuates atherosclerosis and metabolic disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: E1868-1877.
28. Mukherjee S, Schaller MA, Neupane R, Kunkel SL, Lukacs NW (2009) Regulation of T cell activation by Notch ligand, DLL4, promotes IL-17 production and Rorc activation. *J Immunol* 182: 7381-7388.
29. MacKenzie F, Duriez P, Wong F, Nosedà M, Karsan A (2004) Notch4 inhibits endothelial apoptosis via RBP-Jkappa-dependent and -independent pathways. *J Biol Chem* 279: 11657-11663.

30. 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.
31. Quillard T, Devalliere J, Chatelais M, Coulon F, Seveno C, et al. (2009) Notch2 signaling sensitizes endothelial cells to apoptosis by negatively regulating the key protective molecule survivin. *PLoS One* 4: e8244.
32. Helbig C, Gentek R, Backer RA, de Souza Y, Derks IA, et al. (2012) Notch controls the magnitude of T helper cell responses by promoting cellular longevity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 9041-9046.
33. Hellstrom M, Phng LK, Hofmann JJ, Wallgard E, Coultas L, et al. (2007) Dll4 signalling through Notch1 regulates formation of tip cells during angiogenesis. *Nature* 445: 776-780.
34. Guruharsha KG, Kankel MW, Artavanis-Tsakonas S (2012) The Notch signalling system: recent insights into the complexity of a conserved pathway. *Nat Rev Genet* 13: 654-666.
35. Jiang H, Harris MB, Rothman P (2000) IL-4/IL-13 signaling beyond JAK/STAT. *J Allergy Clin Immunol* 105: 1063-1070.
36. Al Haj Zen A, Oikawa A, Bazan-Peregrino M, Meloni M, Emanuelli C, et al. (2010) Inhibition of delta-like-4-mediated signaling impairs reparative angiogenesis after ischemia. *Circ Res* 107: 283-293.
37. Han KH, Gonzalez-Quintial R, Peng Y, Baccala R, Theofilopoulos AN, et al. (2016) An agonist antibody that blocks autoimmunity by inducing anti-inflammatory macrophages. *FASEB J* 30: 738-747.
38. Ma S, Liu M, Xu Z, Li Y, Guo H, et al. (2016) A double feedback loop mediated by microRNA-23a/27a/24-2 regulates M1 versus M2 macrophage polarization and thus regulates cancer progression. *Oncotarget* 7: 13502-13519.
39. Noguera-Troise I, Daly C, Papadopoulos NJ, Coetzee S, Boland P, et al. (2006) Blockade of Dll4 inhibits tumour growth by promoting non-productive angiogenesis. *Nature* 444: 1032-1037.
40. Chiorean EG, LoRusso P, Strother RM, Diamond JR, Younger A, et al. (2015) A Phase I First-in-Human Study of Enoticumab (REGN421), a Fully Human Delta-like Ligand 4 (Dll4) Monoclonal Antibody in Patients with Advanced Solid Tumors. *Clin Cancer Res* 21: 2695-2703.

41. Jia X, Wang W, Xu Z, Wang S, Wang T, et al. (2016) A humanized anti-DLL4 antibody promotes dysfunctional angiogenesis and inhibits breast tumor growth. *Sci Rep* 6: 27985.

Acknowledgments

This work was realized in the context of the IHU-Cesti, LabEx IGO and LabEx Transplantex projects which received French government financial support managed by the National Research Agency (ANR) *via* the "Investment Into The Future" programs ANR-10-IBHU-005, ANR-11-LABX-0016-01 and ANR-11-LABX-0070. The IHU-Cesti project is also supported by Nantes Metropole and the Pays de la Loire Region. This study is also supported by the Region Pays de la Loire, the "Fondation Centaure" (RTRS) which supports a French transplantation research network and by The Agence de la Biomédecine. S.P. was supported by fellowships from the IHU-Cesti and from the Region Pays de la Loire (Paris Scientifiques, HYPROTEC).

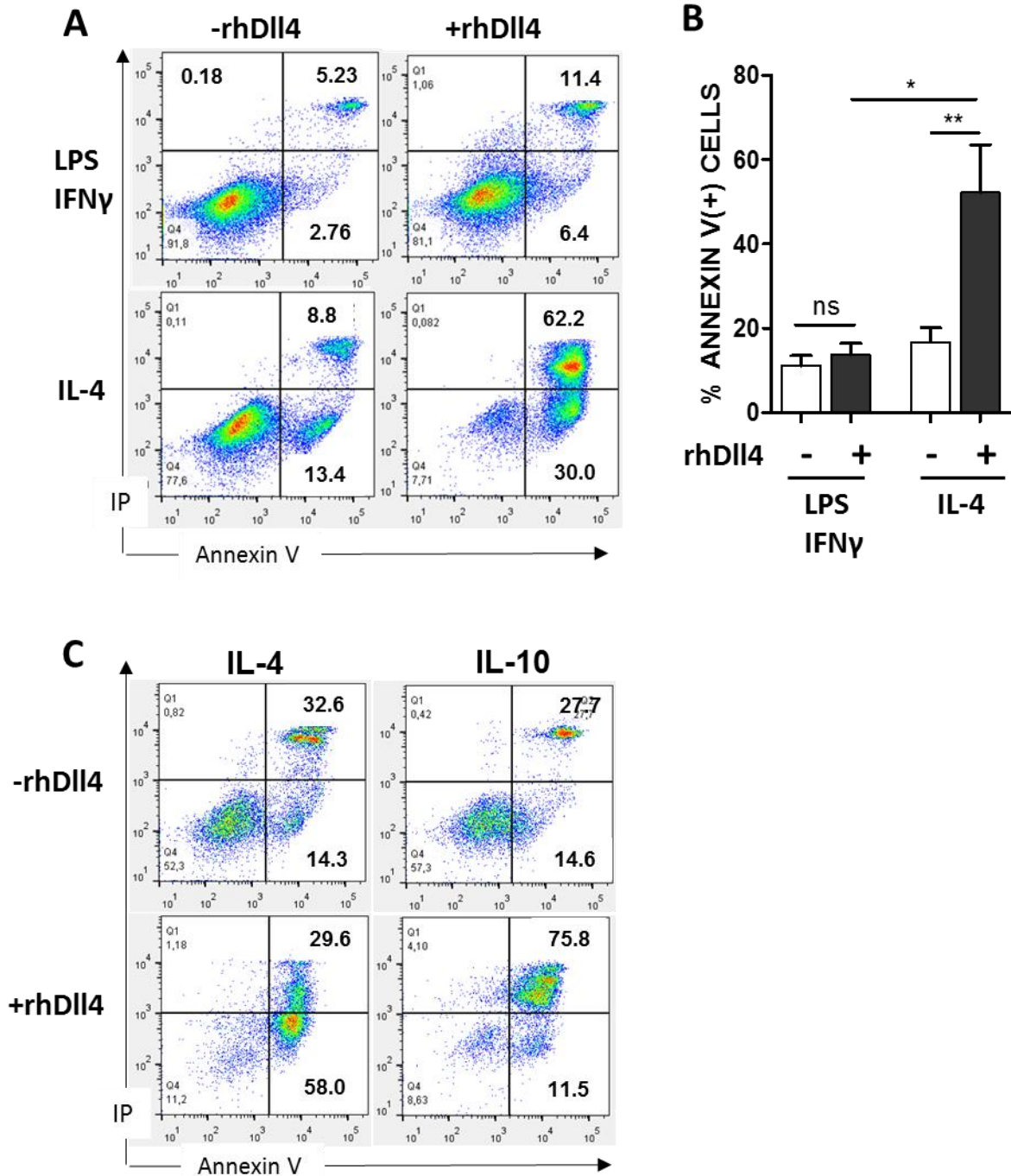


FIGURE 2: DLL4 trigger specific apoptosis during M2 macrophages polarization. Apoptosis analysis after M1(LPS+IFN γ) or M2 (IL-4) polarization with (+rhDLL4) or without (-rhDLL4) immobilized rhDLL4. After 48h of polarization cells were stained by Annexin V/Propidium iodide and fluorescence was measured by flow cytometry. (A) Results are shown as representative dot plot of 5 independent experiments. (B) Percentage of Annexin V positive cells in M1 or M2 polarization (n=5). (C) Apoptosis analysis of IL-4 or IL-10 polarized M2 macrophages with or with/o immobilized rhDLL4. Results are representative dot plot of 2 independent experiments. Whitney statistical test was used for statistical analysis of the results (*p < 0.05 and ** if p < 0.01).

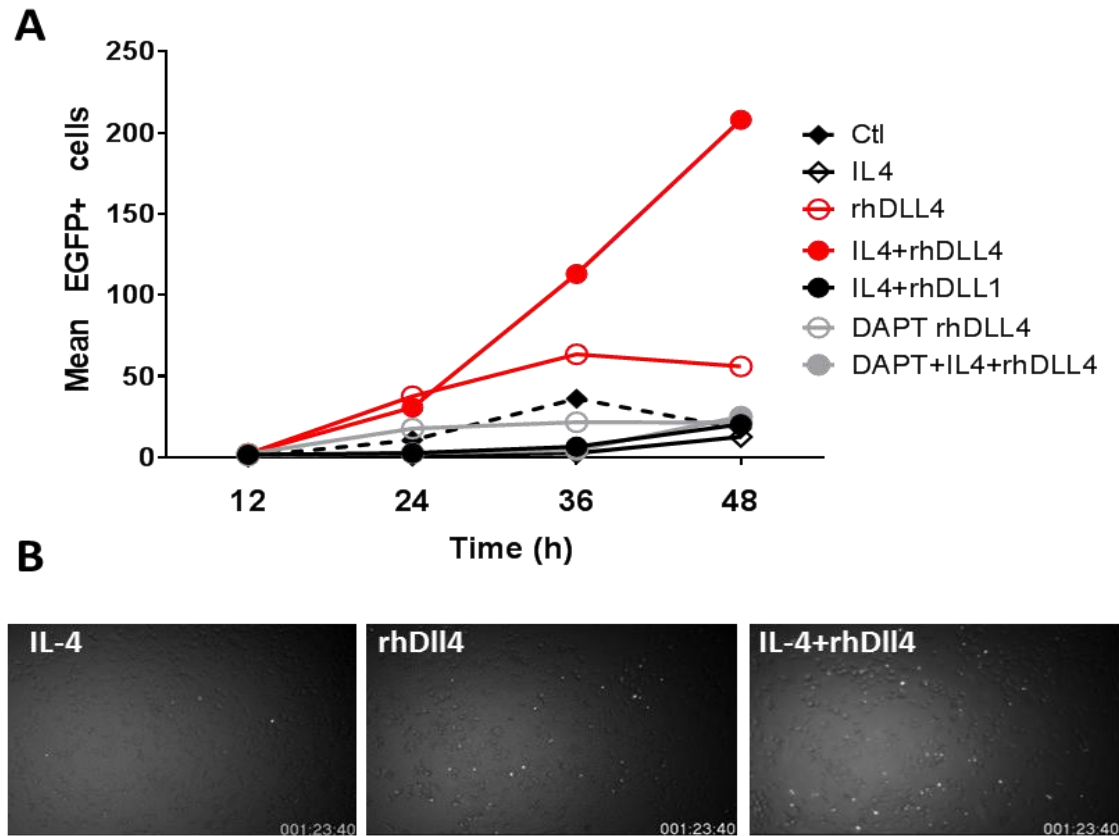


FIGURE 3: Time lapse analysis of DLL4 induced M2 specific apoptosis. Cells were polarized for 48h into M2 macrophages (IL-4) or keep at M0 stage (-IL-4) with or w/o immobilized rhDLL4 or rhDLL1 and with or w/o a γ -secretase inhibitor, DAPT. (A) Graph represents the number of apoptotic cells in each condition during the time of the experiment. Data are expressed as mean of EGFP+ cells (activated caspase 3 positive cells) of 3 measured fields per wells. (B) Representative fields showing apoptotic cells after 48h of polarization for the 3 conditions. Apoptotic EGFP+ cells appear in white.

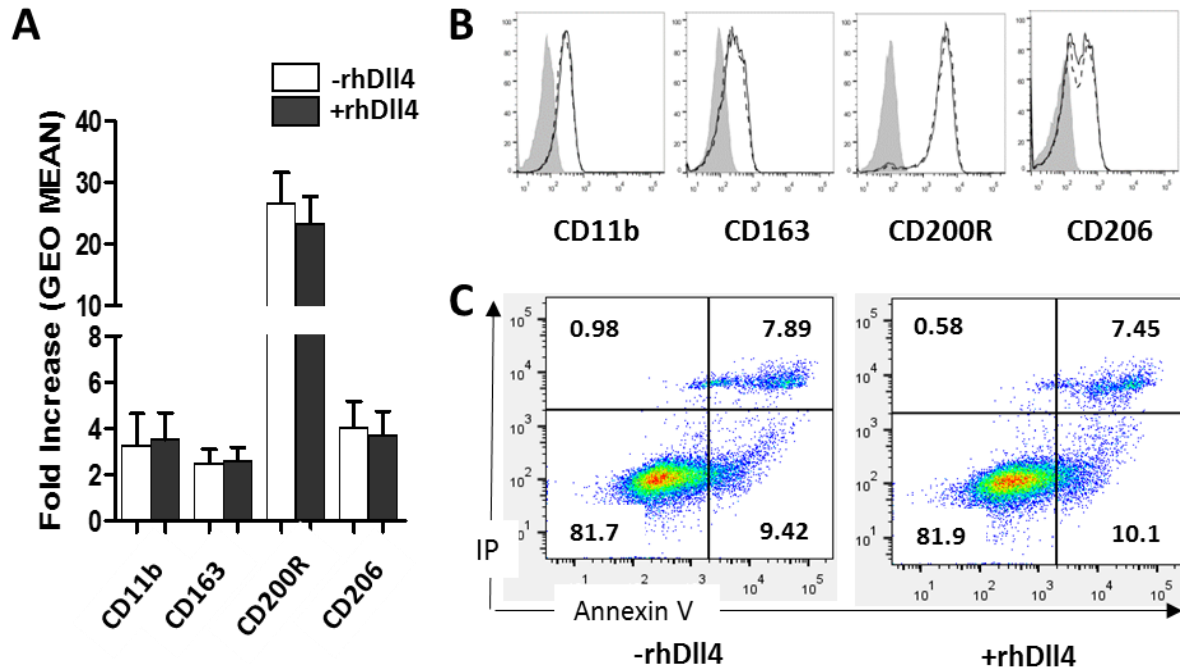


FIGURE 4: Fully Differentiated M2 macrophages resist from DLL4 signaling. Macrophages were polarized into M2 macrophages with IL-4 for 48h then cultivated for 24h with (+rhDLL4) or without (-rhDLL4) immobilized rhDLL4. (A) Quantitative analysis from flow cytometry of four M2 markers (CD11b, CD163, CD200R, CD206) expressed at the surface of M2 macrophages (n=3). Results are expressed as the fold increase, from 3 experiments (B) Representative histograms of the M2 markers expression on M2 macrophages cultivated for 72 with IL-4 and without rhDLL4 (Black line) or 48h plus 24h more on immobilized rhDLL4 (Dashed line). (C) Apoptosis M2 macrophages. After 72h, M2 macrophages are stained with Annexin V/Propidium Iodure and the fluorescence was measured by flow cytometry. Results are express as dot plot representative of 3 independent experiments.

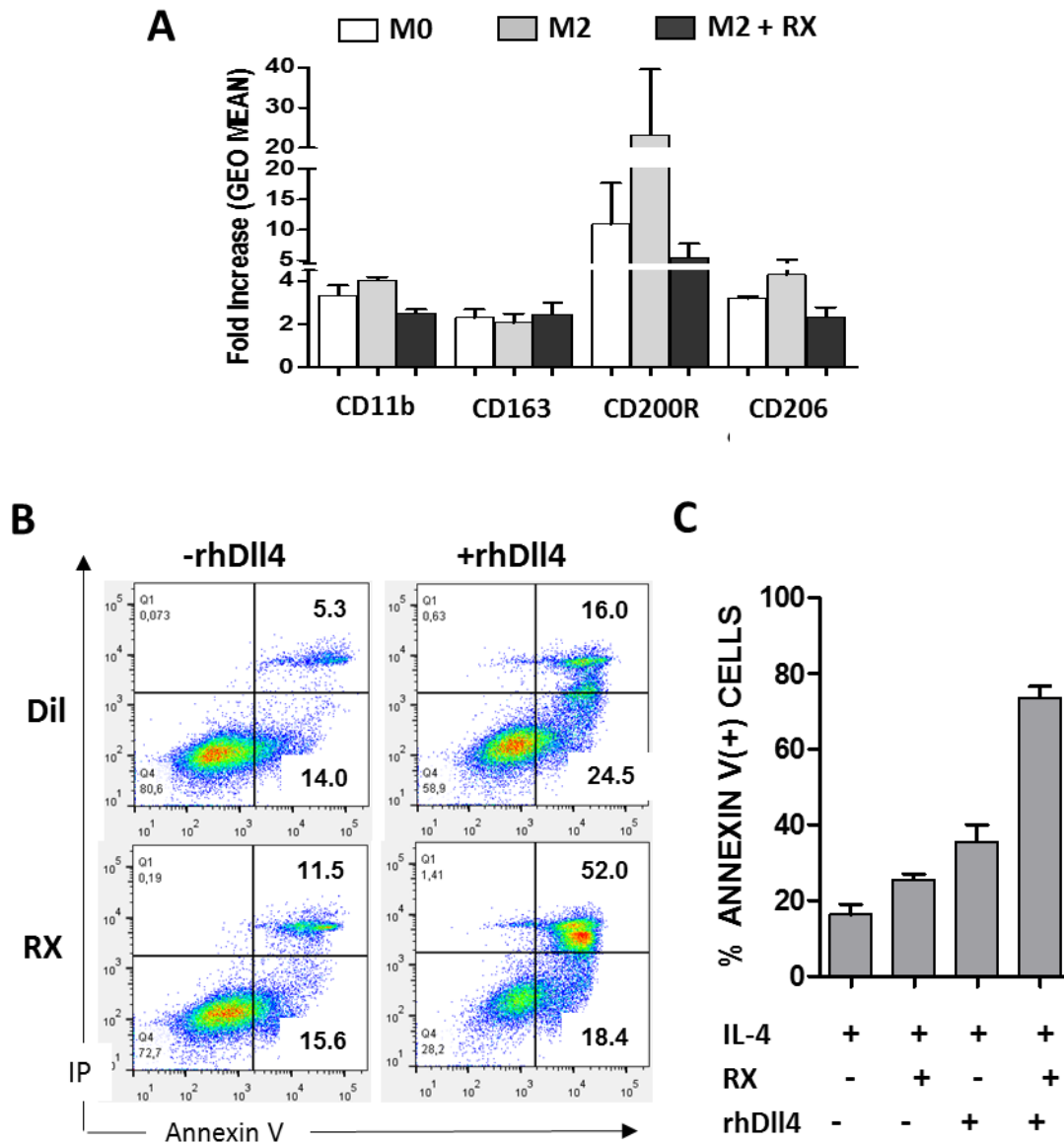


FIGURE 5: Inhibition of JAK/STAT signaling pathway potentiates DLL4 -mediated M2 apoptosis. Cells were polarized into M2 macrophages w/o JAK/STAT inhibitor Ruxolitinib (RX) and with (+rhDLL4) or without (-rhDLL4) immobilized rhDLL4. (A) M2 markers expression at the membrane of M0 or M2 polarized macrophages with or without Ruxolitinib. Results are expressed as fold increase expression (n=2). (B) Apoptosis analysis of M2 polarized cells. After 24h of polarization cells were stained with Annexin V/Propidium Iodure. Results are expressed as representative Dot plots of 2 independent experiments. (C) Histogram representing percentage of Annexin V positive cells (n=2).

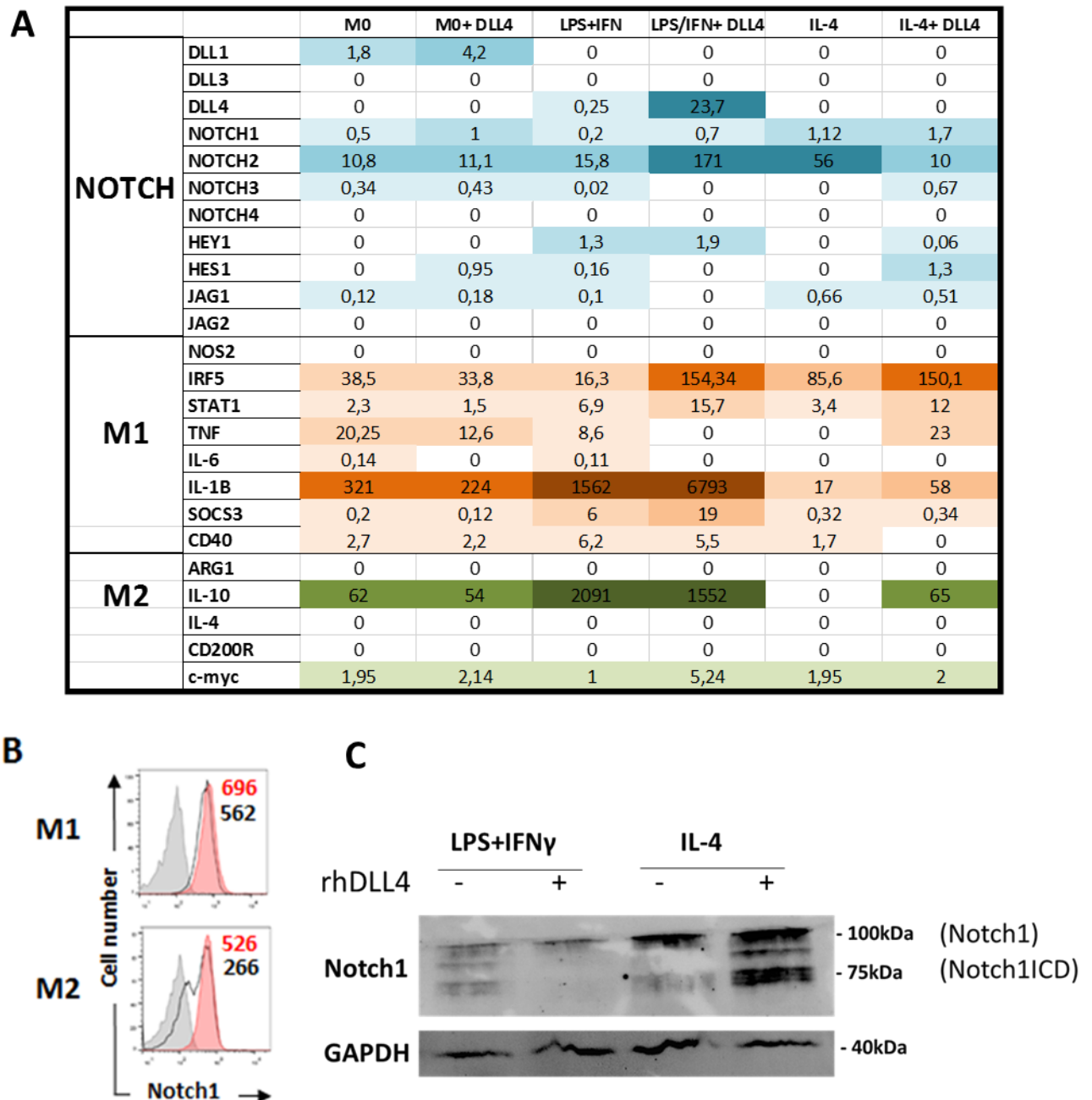


Figure 6. Transcriptional analysis reveals a unique regulatory network mediated by DLL4 in macrophage subsets. (A) QRT-PCR analyses for Notch family members, M1 and M2 markers and regulatory molecules. Macrophages (M0) were incubated or not with LPS+IFN γ , IL-4 and DLL4 for 24h. Results shown are means of triplicates, data are normalized using housekeeping gene (β actin) and expressed as $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Color intensity is proportional to the value (B) Flow cytometry showing Notch1 surface expression in M1 and M2 differentiated for 48h in the absence (red histograms) or the presence (empty histograms) of immobilized DLL4. Irrelevant antibody was used as negative control (grey histograms). Data indicated geometric mean of fluorescence intensities (C) Representative western blots for Notch1ICD and GAPDH in M1 and M2 after differentiation with LPS+IFN γ or IL-4 for 48h in the presence of immobilized DLL4.

Résultats partie III

Rejet humoral aigu en l'absence d'anticorps anti-HLA spécifiques du donneur : Recherche de nouvelles cibles antigéniques

I- Présentation du Projet.

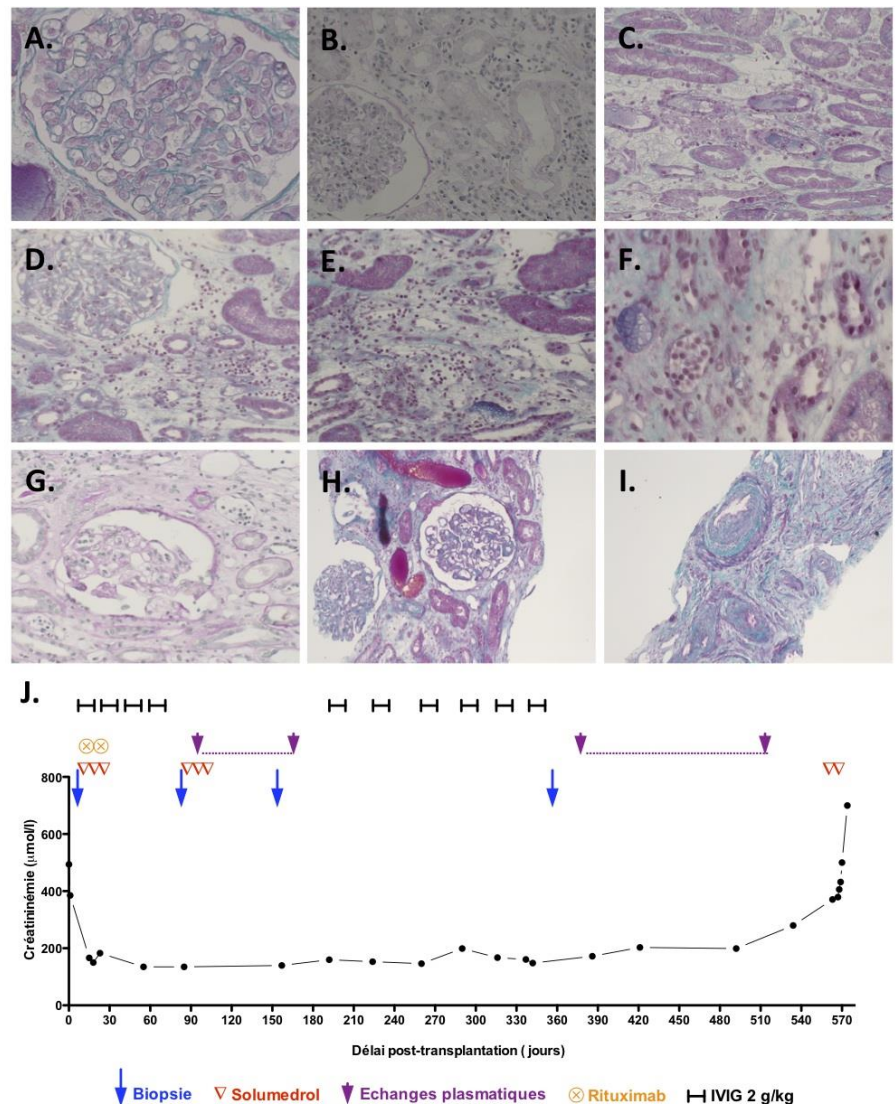
Si le rejet aigu humoral du greffon rénal est lié dans la grande majorité des cas à la présence d'un anticorps anti-HLA dirigé contre un antigène porté par le greffon, quelques rejets aigus dont l'analyse microscopique suggère une origine humorale devant la présence d'un fort infiltrat inflammatoire dans le lit capillaire glomérulaire et péri-tubulaire surviennent chez des patients pour lesquels la recherche d'anticorps anti-HLA, même avec les techniques les plus sensibles, ne montre pas de DSA anti-HLA (Figure 21). Alors même que cette entité n'est pas reconnue par la classification internationale de Banff (Haas *et al.*, 2014), elle a pu être associée à un pronostic péjoratif de la greffe. **Ceci suggère la présence d'anticorps non-HLA capables d'induire des lésions du greffon similaires à celles observées chez les patients porteurs de DSA anti-HLA** (Dragun *et al.*, 2013).

Les déterminants antigéniques de ces anticorps non-HLA demeurent largement méconnus avec uniquement quelques antigènes non-HLA identifiés tels que MICA (Sumitran-Holgersson *et al.*, 2002), le récepteur de type 1 de l'angiotensine II chez les transplantés rénaux (Dragun *et al.*, 2005), la vimentine chez des transplantés cardiaques (Jurcevic *et al.*, 2001) et le collagène V chez les transplantés pulmonaires (Burlingham *et al.*, 2007). En l'absence de l'identification claire des cibles antigéniques, on parle alors d'anticorps anti-cellules endothéliales (AECA, *Anti-Endothelial Cell Antibodies*). Les CE du greffon sont en effet les principales cibles des anticorps préformés ou *de novo* après la greffe. En fonction de sa spécificité, de son titre et de ses caractéristiques, la fixation de l'allo-anticorps est susceptible d'activer la cascade du complément qui induit la lyse cellulaire et des mécanismes microthrombotiques mais également de contribuer à une dysfonction endothéliale (activation, apoptose) ou encore d'activer des phénomènes d'ADCC (*Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*). Plusieurs travaux antérieurs, y compris les nôtres, ont démontré que les cellules endothéliales du greffon expriment les molécules HLA de classe I et de classe II du donneur et des molécules HLA non classiques (Coupel *et al.*, 2007 ; Le Bas-Bernardet *et al.*, 2003). Ces anticorps dirigés contre des molécules polymorphes non classiques du complexe majeur d'histocompatibilité comme MICA et HLA-E contribuent au rejet du greffon. De plus, des anticorps anti-cellules endothéliales ne ciblant pas des

molécules HLA ont aussi été décrits chez certains sujets transplantés. Par exemple, les anticorps anti-récepteurs de type 1 de l'angiotensine II (AT1R) peuvent induire un rejet aigu humoral chez les transplantés rénaux non-immunisés contre des molécules HLA (Giral *et al.*, 2013).

Figure 21 : Exemple de rejet aigu humoral en l'absence d'anticorps anti-HLA spécifiques du donneur (d'après Delville *et al.*, 2016).

Ce rejet aigu humoral survenu dans le service de transplantation rénale de l'hôpital Necker chez un patient de 39 ans greffé pour la seconde fois dans le cadre d'un don vivant apparenté (le donneur est son frère, ABO identique et HLA identique pour les loci A, B, C, DR, DQ et DP). Le diagnostic est porté au troisième jour de greffe devant une anurie brutale après reprise immédiate



de diurèse et de fonction du greffon. La biopsie du greffon à J3 montre une glomérulite g3 (A.), une capillarite péri-tubulaire cpt3 (B.), un œdème interstitiel diffus et des plages de suffusions hémorragiques (C.). Une biopsie réalisée à 2 mois post-transplantation montre la persistance de lésions de glomérulite (D.), de capillarite et d'œdème (E. et F.). A 18 mois, la glomérulite reste aussi intense (G.) mais s'associe à des lésions de glomérulopathie d'allogreffe cg3 (G. et H.) et des lésions vasculaires pré-occlusives cv3 (I.). Cette évolution

défavorable s'est produite malgré plusieurs lignes de traitement du rejet (J.) (Delville et al., 2016).

Malgré la gravité de cette entité mal identifiée d'AMR sans anticorps anti-HLA spécifiques du donneur, les données disponibles restent très limitées, principalement obtenues de la description de cas isolés ou de petites séries. Il y a donc un besoin urgent de fournir une description clinico-pathologique de ce rejet particulier. Par ailleurs, l'identification des cibles cellulaires de ces anticorps non-HLA améliorerait notre compréhension des mécanismes impliqués. **L'identification et la caractérisation de ces anticorps modifieraient non seulement notre approche diagnostique et thérapeutique de ces rejets, mais ouvriraient aussi la voie au développement de nouveaux outils pour le suivi des anticorps pathogènes.**

Une étude nationale multicentrique a donc été initiée par le groupe du Pr. Anglicheau et du Dr. Delville à l'hôpital Necker de Paris pour rechercher la présence d'anticorps AECA et identifier leurs cibles cellulaires et antigéniques dans une cohorte homogène de patients avec un diagnostic d'AMR sans DSA. Cette étude comprend plusieurs étapes dont la première consiste en la relecture des biopsies pour une classification des lésions, une recherche d'anticorps anti-HLA et anti-MICA systématique et centralisée (EFS des Pays de la Loire, Nantes). Cette étude translationnelle correspond à une analyse observationnelle de cohorte et ne comprend donc qu'un seul groupe de patients. Elle comprend une première partie rétrospective puis une partie expérimentale prospective.

C'est à cette partie expérimentale prospective que j'ai participé au cours de ma thèse par l'étude de la réactivité des sérums des patients pour un panel de cellules vasculaires traitées ou non avec des cytokines permettant de reproduire un contexte inflammatoire.

L'objectif de cette partie du projet était **d'identifier et de décrire pour la première fois une ou des cible(s) cellulaire(s) des anticorps non-HLA pathologiques impliqués dans un rejet humoral mais également d'établir une comparaison et éventuellement une hiérarchie des sérums selon leur réactivité pour faciliter la sélection des sérums utilisés dans la seconde étape du projet.** Cette seconde étape consiste en l'analyse protéomique d'identification des cibles protéiques reconnues par ces anticorps et sera réalisée par Pr. Anglicheau et le Dr. Delville.

II- Matériel et méthodes

1- Inclusion des patients

L'inclusion des sérums des patients présentant un rejet humoral en absence de DSA est effectuée sur la base des critères ci-dessous :

- Patients ayant eu une biopsie pour cause, effectuée dans le cadre du soin, motivée par une dégradation de fonction du greffon ou une non-reprise de fonction,
- Effectuée dans les 3 premiers mois de transplantation,
- Diagnostiquant un rejet d'allure humorale (score de Banff g+cpt≥3),
- Avec une recherche d'anticorps anti-HLA spécifiques du greffon négative pour HLA-A/-B/-Cw/-DR/-DQ/-DP) par technique Luminex *Single Antigen*

Selon ces critères, sur les sérums du jour du rejet des 40 patients centralisés et testés à l'EFS de Nantes, 36 se sont révélés réellement négatifs pour la présence d'anticorps anti-MICA, anti-HLA-I et -II spécifiques du donneur.

2- Cultures cellulaires

La réactivité des sérums a été testée sur différents types cellulaires constituant la structure vasculaire dont des cellules musculaire lisses vasculaires ainsi que différents sous-types de cellules endothéliales: des cultures primaires de cellules endothéliales macrovasculaires d'artères (HAEC, Human Artery Endothelial Cells) issues de notre bio-collection mais également sur une lignée de cellules endothéliales microvasculaires glomérulaires (CiGenc, Conditionally immortalized human Glomerular endothelial cells).

Les HAEC sont cultivés en milieu ECBM (Endothelial Cells Basal Medium, Promocell, Heidelberg, Allemagne) supplémenté avec 10% de SVF (Sérum de Veau Fœtal), 0,4% d'héparine, de l'hydrocortisone (1 µg/mL), du facteur de croissance des fibroblastes humain

(hFGF, 1 ng/mL), du facteur de croissance épithéliale (EGF, 0,1 ng/mL), de la pénicilline (100 U/mL) et de la streptomycine (0,1mg/mL) à 37°C et 5% de CO₂. Les HAEC sont utilisées entre les passages P3 et P6. Les SMC et les CiGenc sont cultivés en milieu basal EGM-2 (Endothelial Growth Medium, Lonza, Walkersville, MD, USA) supplémenté par le kit EGM-2MV (Milieu de culture microvasculaire, Lonza) contenant 5% de SVF, 0,04% d'hydrocortisone, 0,4% de hFGF, 0,1% de VEGF, 0,1% de R3-IGF-1, 0,1% d'acide ascorbic, 0,1% d'EGF et 0,1% de GA-1000. Afin d'adopter le profil phénotypique microvasculaire les CiGenc sont cultivées à 33°C puis différenciées par 7 jours de culture à 37°C. Les cellules sont utilisées à confluences.

3- Traitement et activation des cellules

Afin de reproduire le phénotype des cellules observé dans un contexte inflammatoire, les CE ont été traitées avec des cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α (100 U/ml) et l'IFN- γ (100 U/ml) pendant 48h. Après stimulation par ces cytokines, le phénotype des cellules est contrôlé par cytométrie en flux.

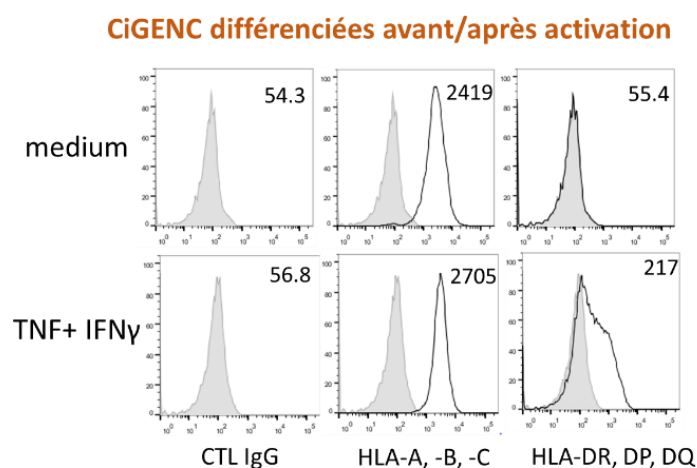


Figure 22. Phénotype des cellules CiGenc avant et après une stimulation de 48h avec du TNF- α et de l'IFN- γ . Un contrôle négatif est réalisé avec une IgG contrôle (histogramme gris) pour chaque condition. Le marquage spécifique est montré (histogramme blanc) et les moyennes géométriques de fluorescence sont indiquées.

Ainsi les cellules traitées par le TNF- α et l'IFN- γ augmentent l'expression de différentes molécules dont les molécules du HLA-I et -II, mais également HLA-E ; ICAM-1 et VCAM-1 (phénotype complet en Annexe 1). L'augmentation de l'expression de molécules pro-

inflammatoires permet d'augmenter le nombre de cibles antigéniques possibles disponibles pour le test du cross-match endothéliale.

4- Test de crossmatch cellulaire.

Une fois la confluence atteinte, les différentes cultures cellulaires sont lavées au PBS puis décollées par la Trypsine-EDTA 1%. 50 000 cellules sont réparties dans une plaque 96 puits à fond conique avant d'être lavées par un tampon de PBS 1% BSA 0,05% Azide de sodium. Après deux lavages les cellules sont incubées avec les sérums des patients préalablement dilués au ¼ pendant 30 minutes. Une fois l'incubation primaire effectuée, les cellules sont à nouveau lavées deux fois avant d'être incubées avec l'anticorps secondaire Fab'2 anti IgG humaine couplé à la FITC ou un anti-IgM humaine couplé à la PE pendant 20 minutes. Une fois le marquage secondaire réalisé les cellules sont lues par cytométrie en flux (LSR II R&D systems) et les moyennes géométriques des histogrammes sont analysées. Les moyennes géométriques obtenues lors de la lecture par cytométrie en flux ont été normalisées par la moyenne géométrique du contrôle isotypique. Les sérums sont considérés comme positifs si la moyenne géométrique normalisée est d'au moins deux fois supérieure au contrôle isotypique.

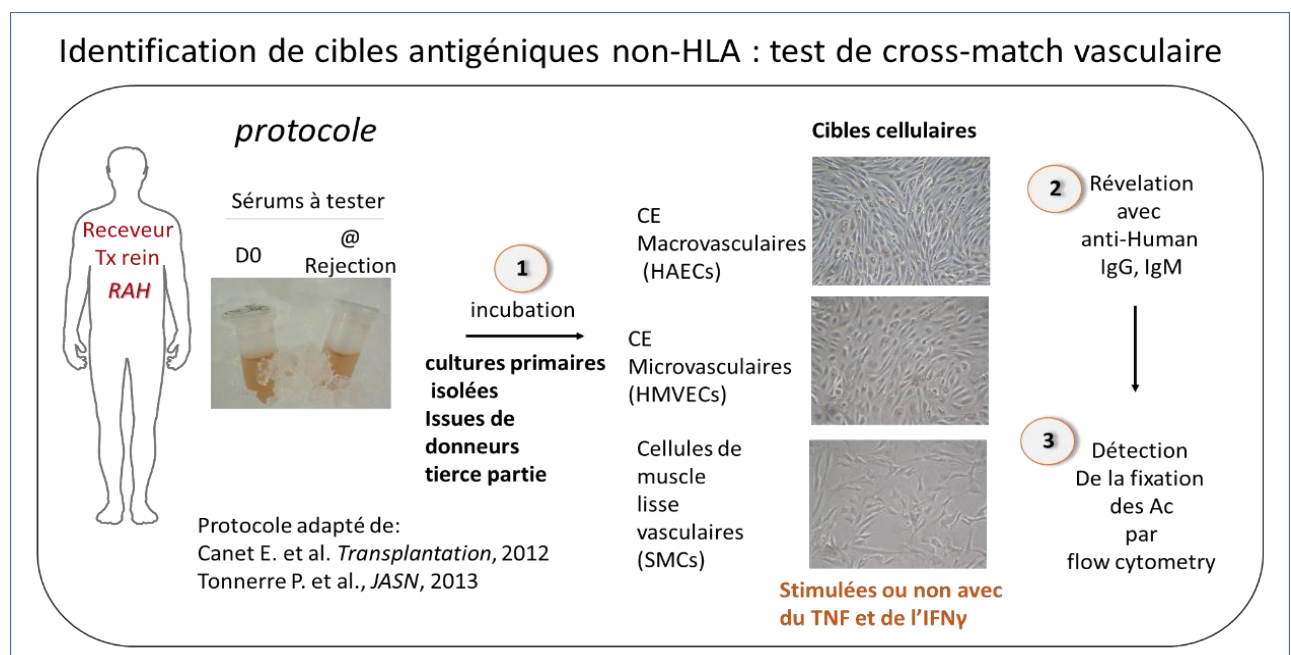


Figure 23 : Représentation schématique de l'approche méthodologique utilisée pour la mise en évidence d'anticorps réactifs vis à vis des cellules vasculaires.

III- Résultats.

1- Sélection des patients et des sérums.

Au total, 52 sérums de patients, du jour de la greffe et/ou du jour du rejet, ont été centralisés à Nantes. 40 sérums, prélevés le jour du rejet, ont été analysés pour la recherche d'anticorps anti-HLA et anti-MICA par Luminex. Cette détection et caractérisation des d'anticorps anti-HLA et anti-MICA a été réalisée par le laboratoire HLA de l'EFS des Pays de la Loire à Nantes (Dr. Cesbron-Gautier et Dr. Castagnet-Malard). A l'issue de la recherche de réactivités anti-HLA et anti-MICA, 36 patients ont été inclus pour notre étude car ils ne possédaient pas d'anticorps anti-HLA-I, -II ou MICA ou possédaient des anticorps non DSA (voir annexe 2). Sur ces 36 patients, nous avons dans un premier temps focalisé notre étude sur 12 sérums de patients ne présentant aucune détection d'anticorps anti-HLA-I, -II ou anti-MICA (Les sérums des autres patients montrent la présence d'anticorps anti-HLA-I, -II ou MICA mais n'étant pas des DSA et dont la MFI détectée est très variable). Aucun de ces patients ne possède d'anticorps anti-HLA ou anti-MICA détectable par la technique sensible de Luminex et les sérums peuvent donc être incubés avec des cellules vasculaires non génotypées sans risque de cross-réactivités. Dans un second temps l'étude a été élargie aux sérums possédant des anticorps anti-HLA détectés par Luminex avec les plus faibles réactivités.

2- Profils de réactivités des sérums.

Les sérums prélevés le jour du rejet ont été analysés par la technique de « crossmatch vasculaire » développée dans notre équipe pour rechercher des réactivités ciblant les cellules endothéliales de la micro (CiGenc) ou macrovasculature (HAEC) et/ou des cellules de muscle lisse vasculaires (SMCs). Nous avons tout d'abord analysé la réactivité des sérums pour les cellules endothéliales issues d'artères (HAEC), utilisées dans notre équipe pour la détection d'anticorps anti-HLA ou anti-MICA chez les patients transplantés rénaux (Canet *et al.*, 2012 ; Tonnerre *et al.*, 2013). En effet, ces cellules expriment en culture, de façon basale, les molécules MICA et HLA-I et de manière induite les molécules du HLA-II ainsi que (Chauveau *et al.*, 2014). Nous n'avons pas observé de réactivité significative pour l'ensemble

des sérums testés (Figure 24). Ce résultat valide, d'une part, l'absence de cross-réactivité due à des anti-HLA/MICA non détectés par Luminex et, d'autre part, suggère que les HAEC n'expriment pas le(s) antigène(s) reconnu(s) par les anticorps développés par ces patients transplantés.

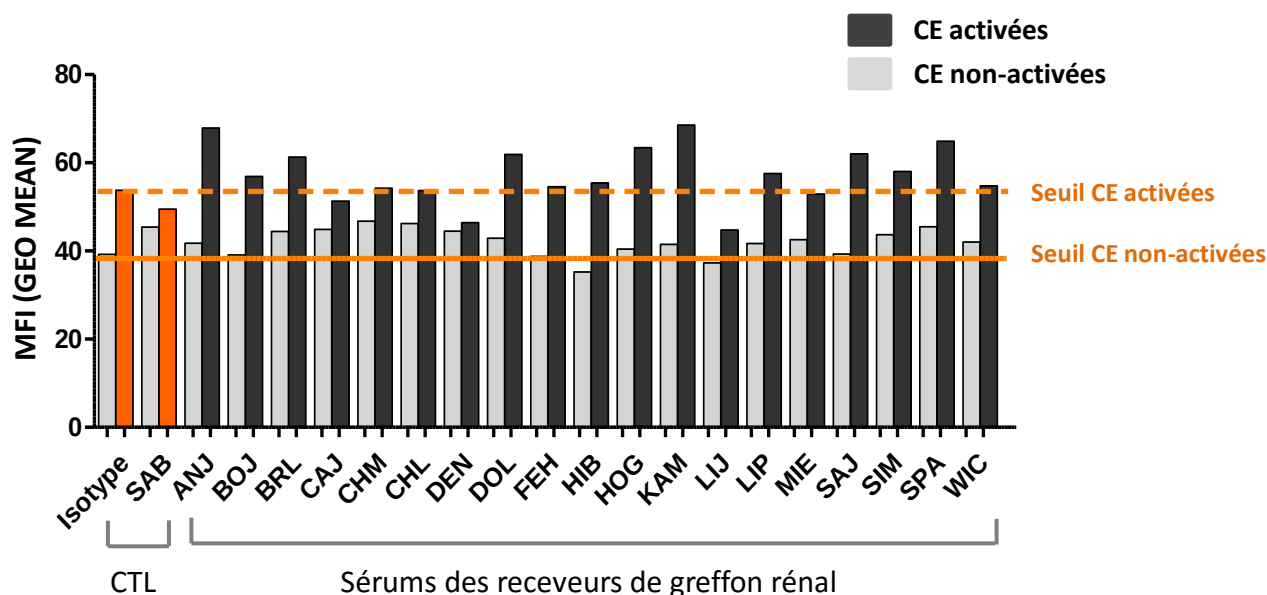


Figure 24 : Analyse de la réactivité des sérums du jour du rejet (dilution 1/4) pour les CE macrovasculaires. Le test de crossmatch a été réalisé sur des cellules non stimulées ou stimulées pendant 48h avec du TNF- α et l'INF- γ . Les résultats présentés montrent les moyennes géométriques de fluorescence obtenue par cytométrie en flux pour chacun des patients testés.

Pour poursuivre la détection des anticorps nous avons donc utilisé deux autres types cellulaires : des CE microvasculaires (lignée de cellules endothéliales glomérulaires rénales, CiGenc) et des cultures primaires de SMC vasculaires. Contrairement aux résultats obtenus avec les HAEC, de nombreux sérums ont réagi avec la lignée CiGenc (Figure 25) avec des intensités variables. La quasi-totalité des sérums semble contenir des anticorps réactifs contre ces cellules. L'intensité des réactivités est cependant variable et on distingue 3 profils : faible, moyenne et forte.

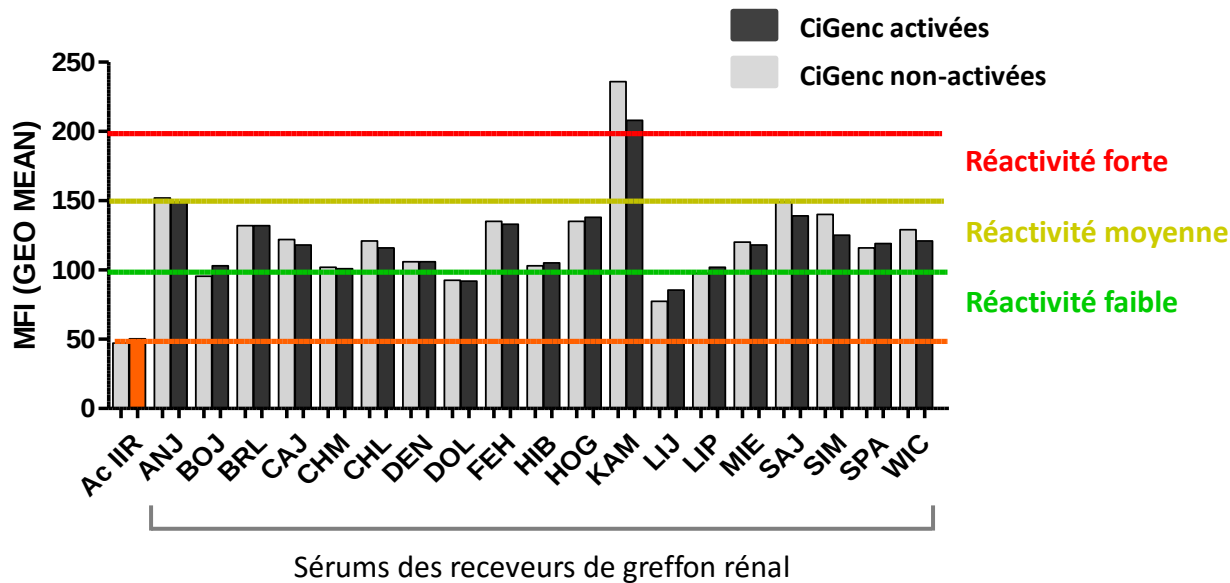


Figure 25 : Analyse de la réactivité des sérums prélevés le jour du rejet (dilution ¼) pour les CE microvasculaires CiGenc. Le test de crossmatch a été réalisé sur des cellules non stimulées ou stimulées pendant 48h avec du TNF- α et de l'INF- γ . Les résultats présentés montrent les moyennes géométriques de fluorescence obtenue par cytométrie de flux pour chacun des patients testés.

De façon intéressante le traitement des cellules avec des cytokines pro-inflammatoires ne révèle pas de réactivité supplémentaire suggérant que les antigènes reconnus sont exprimés de façon constitutive et ne semblent pas régulés par l'inflammation. En contrôle, 5 sérums de volontaires sains ont également été lu lors d'un cross match endothéliale sur les cellules microvasculaires (Figure 26A). La moyenne des moyennes géométriques normalisées de ces 5 contrôles est équivalente à 1,42 fois la moyenne géométrique de l'isotype contrôle (Figure 26B).

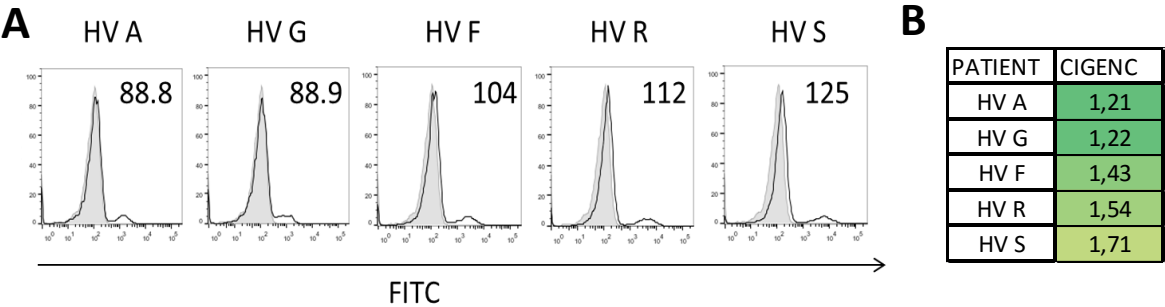


Figure 26 : Réactivité des sérums de 5 donneurs volontaires sains (HV) sur les cellules CiGenc. (A) Histogrammes obtenus lors de la lecture par cytométrie en flux. (B) Tableau représentant les valeurs des moyennes géométriques normalisées.

Le classement réalisé par la comparaison des moyennes géométriques normalisées indique que 18/20 des sérums du jour du rejet testés présentent une réactivité d'intensité variable, de faible à très forte, pour les CE microvasculaires. Un patient présente également une réactivité forte vis-à-vis des SMC. Cette réactivité est même plus forte pour les SMC que pour les CE microvasculaire. Globalement, les réactivités pour les CE macrovasculaires sont faibles et non significatives par rapport aux contrôles (Figure 27).

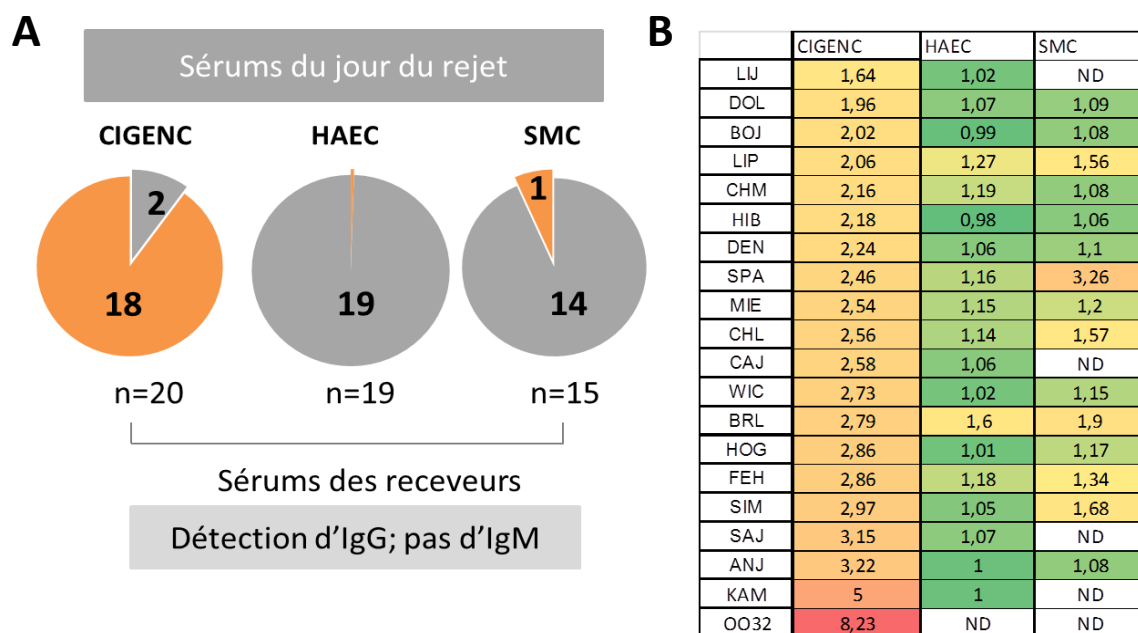


Figure 27. Synthèse de l'analyse des réactivités des sérums du jour du rejet sur les différents types cellulaires testés. (A) Profils des réactivités. (B) Tableau de l'intensité de la réactivité des sérums selon les valeurs des moyennes géométriques normalisées des 20 patients analysés, les sérums sont classés selon leur réactivité contre les cellules endothéliale microvasculaire du vert (pas de réactivité) au rouge (très forte réactivité).

3- Titres relatifs des anticorps non-HLA associés au rejet aigu humoral.

Pour évaluer le titre des anticorps dans les sérums des patients, nous avons réalisé des dilutions sériées de certains sérums positifs qui ont été analysées par crossmatch sur les cellules CiGenc. La figure 28 montre deux exemples (receveurs KAM et 0032) pour lesquels des réactivités pour les cellules CiGenc sont observées de façon dépendante de la dilution avec une détection significative jusqu'à la dilution 1/128 suggérant la présence de ces anticorps à des titres élevés chez ces patients.

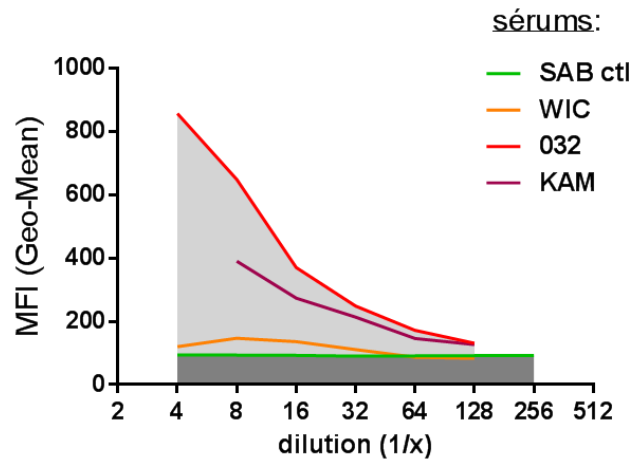


Figure 28: Réactivités des sérums contrôles (CTL SAB) ou de patients présentant un rejet aigu humoral (WIC, 032, KAM) utilisant des dilutions limites des sérums incubés avec les cellules CiGenc.

Pour le patient KAM nous avons pu comparer la réactivité des sérums prélevés le jour de la greffe (J0) et au moment du rejet. Les résultats sont montrés dans la figure 28 ; ils indiquent des titres élevés (>1/128) en anticorps et relativement similaires à J0 et au moment du rejet. Ce résultat suggère que les anticorps ne sont pas induits par la transplantation mais peuvent être déjà présent au moment de la greffe.

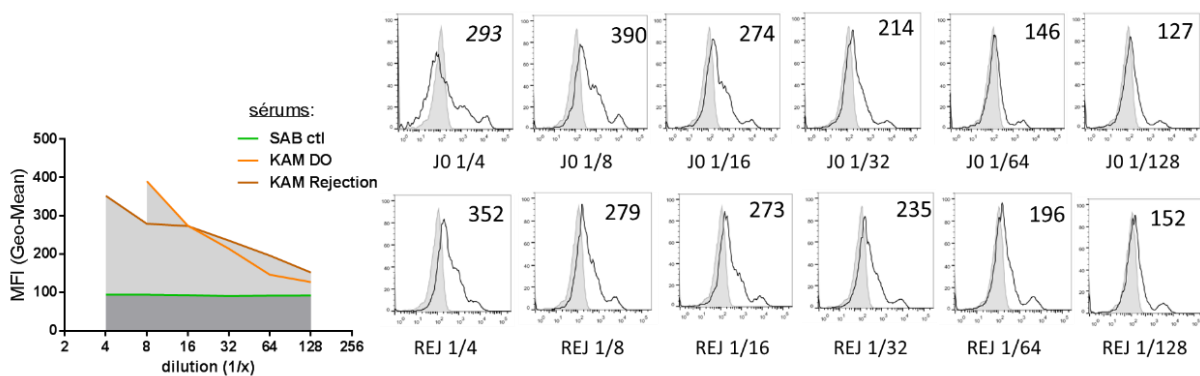


Figure 29 : Réactivités des sérums contrôles (CTL SAB) ou du patient avec RAH (KAM) prélevés le jour de la greffe (J0) et au moment du rejet (Rej) utilisant des dilutions limites des sérums incubés avec les cellules CIGENC.

4- Réactivité des sérums pour les cellules CiGenc différenciées ou non différenciées.

Nous avons comparé la réactivité des sérums vis-à-vis des cellules CiGenc avant et après différenciation (Figure 30). Notre étude montre une réactivité plus forte des sérums pour les cellules différenciées que pour les cellules non différenciées suggérant que l'antigène reconnu est surexprimé par les cellules différenciées.

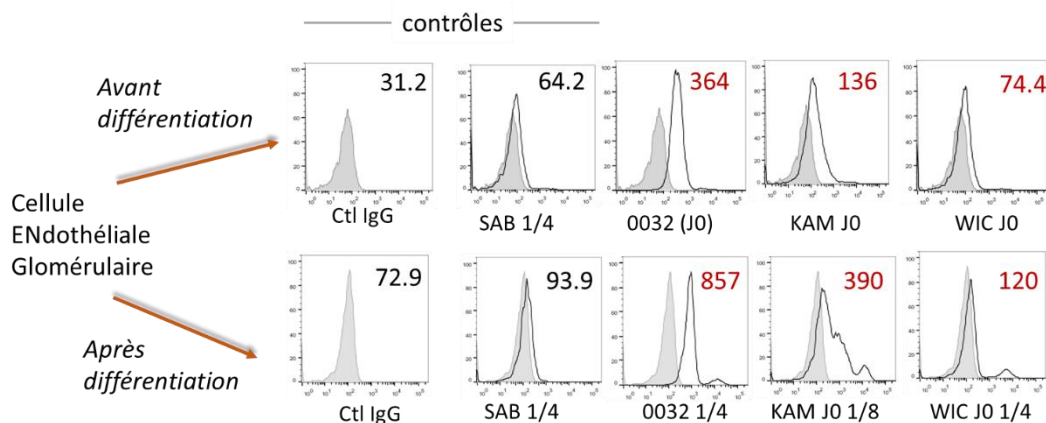


Figure 30 : Comparaison de la réactivité des sérums pour des cellules rénales CiGenc différenciées ou non. Un pool de sérums AB (SAB) est utilisé comme contrôle négatif pour définir le seuil de réactivité positif.

IV- Réactivités vasculaires des Anticorps Non HLA et Rejet humoral aigu : synthèse des résultats, limites et perspectives.

Nos résultats proposent quelques pistes nouvelles pour l'identification des anticorps non HLA associés au rejet aigu humoral en transplantation rénale. Basé sur un test de crossmatch comparable à ceux utilisés auparavant pour la détection prégreffe des alloanticorps anti-HLA chez les transplantés, notre approche méthodologique permet une première description des anticorps et de leurs possibles cibles antigéniques et cellulaires. Nous montrons que les anticorps détectés dans notre étude réagissent de façon majoritaire avec les CE glomérulaires et parfois avec les cellules vasculaires du muscle lisse. Cette étude semble donc indiquer que les anticorps détectés sont des anticorps anti-cellules endothéliales comme ceux reportés dans une étude récente du groupe de Minnie Sarwal (Jackson *et al.*, 2015) mais limite leur territoire à l'endothélium microvasculaire glomérulaire. L'absence de réactivité suggère en effet que les antigènes reconnus ne sont pas exprimés par les CE de

gros vaisseaux, représentés par les cellules HAEC dans notre étude. Cet/ces antigène(s) sont plus exprimés par les CE microvasculaires glomérulaires différenciées que non différenciées et n'est pas augmentée par un traitement pro-inflammatoire associant TNF- α et IFN- γ . Nous pouvons également supposer à la vue de nos premiers résultats que le cocktail TNF- α + IFN- γ provoque une diminution de l'expression de l'antigène reconnu. Ce point reste à confirmer et à documenter en traitant les cellules avec chacune des cytokines pour exclure un effet antagoniste des deux cytokines sur une régulation. Concernant les anticorps, ils peuvent être détectés dans le sérum du jour de la greffe et ne semblent pas plus abondants au jour du rejet suggérant que ces anticorps pourraient être préformés, et déjà présents au moment de la greffe. Un aspect délicat de cette étude est d'établir un lien causal entre la détection de ces anticorps dans nos tests cellulaires et le rejet humoral observé chez les patients. Pour cela deux populations contrôles ont été testées en parallèle des receveurs avec un rejet humoral sans anti-HLA : une série de sérums issus de donneurs/volontaires sains (Figure 26) et une série (n=10) de sérums issus de patients non greffés atteints d'une pathologie rénale. A première vue, dans cette dernière série sur 10 sérums testés, 1 sérum s'est révélé faiblement positif et un « border line », les 8 autres étant négatifs (Figure 31) si l'on se réfère aux moyennes géométriques normalisées.

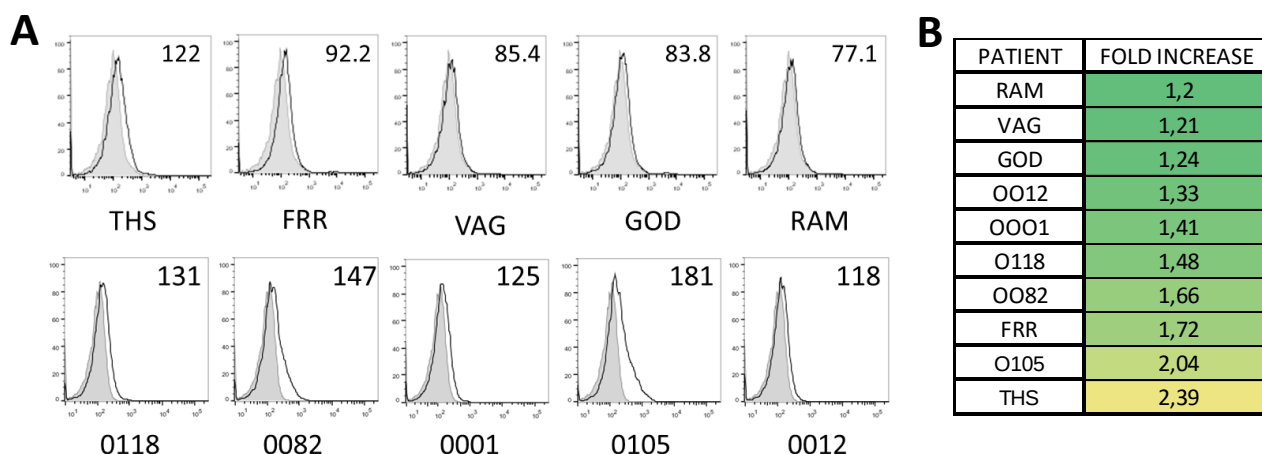


Figure 31 : Réactivité des sérums de patients non-greffés atteints d'une pathologie rénale (n=10). (A) Histogrammes représentant la moyenne géométrique de fluorescence obtenues lors de la lecture au FACS. (B) Valeur de l'expression de la GEO MEAN normalisé par l'expression du contrôle isotype secondaire. Les sérums ont été analysés en deux séries séparés.

Cependant les sérums 0082 et 0105 dépassent ce seuil de positivité s'ils sont dilués au 1/8 (2.12 et 2.39 respectivement, résultats non montrés). De plus, à la vue du décalage de l'histogramme FACS nous considérons ces deux sérums comme positifs. 3 sérums de cette

série contrôle se révèlent donc positifs à la lecture. Ce résultat, qui n'est pas incompatible avec la présence de ces anticorps avant la greffe dans notre cohorte, pourrait indiquer un lien entre une maladie rénale initiale et le développement de ces anticorps chez les patients.

L'étude protéomique sera réalisée dans les prochains mois et nous pourrons alors rechercher sur les cellules endothéliales microvasculaires glomérulaires les cibles antigéniques identifiées par l'analyse des sérums par protoarray pour valider nos observations. La figure 32 résume les résultats de cette étude.

A Anticorps non HLA impliqués dans le Rejet Humoral

Antigènes

- CE glomérulaires
- Différentiées
- +/- cellules vasculaires du muscle lisse
- Expression constitutive
- Non augmentée par l'inflammation
- Diminuée par l'inflammation?
- Absent des cellules:
 - Endothéliales macrovasculaires
 - Épithéliales rénales

Anticorps

- Préformés
- Présents le jour de la greffe
- Titre ne varie pas post-greffe
- Absents dans les sérum de donneurs sains
- Présents chez qq patients avec pathologies rénales

B

	PATIENT	GEO MEAN	FOLD INCREASE
CTL	RAM	75,8	1,2
HV	HV A	88,8	1,21
CTL	VAG	76,6	1,21
HV	HV G	88,9	1,22
CTL	GOD	78,3	1,24
CTL	OO12	118	1,33
CTL	OOO1	125	1,41
HV	HV F	104	1,43
HV	HVA	93,3	1,48
CTL	O118	131	1,48
HV	HV R	112	1,54
	LIJ	77,3	1,64
CTL	OO82	147	1,66
HV	HV S	125	1,71
CTL	FRR	109	1,72
	DOL	92,7	1,96
	BOJ	95,5	2,02
CTL	O105	181	2,04
	LIP	97,5	2,06
	CHM	102	2,16
	HIB	103	2,18
	DEN	106	2,24
CTL	THS	151	2,39
	SPA	116	2,46
	MIE	120	2,54
	CHL	121	2,56
	CAJ	122	2,58
	WIC	129	2,73
	BRL	132	2,79
	HOG	135	2,86
	FEH	135	2,86
	SIM	140	2,97
	SAJ	149	3,15
	ANJ	152	3,22
JO	OO65	198	4,19
	KAM	236	5
	OO32	461	8,23

1.42 = MOY DES HV

Figure 32 : Synthèse des résultats obtenus. (A) résumés des caractéristiques des antigènes reconnus par les anticorps présents dans les sérums des patients receveurs d'un greffon rénale étant possiblement à l'origine du rejet aigu humoral non associé aux anticorps anti-HLA. (B) Résumé des valeurs de moyennes géométriques obtenues lors de la lecture du cross-match endothéliale par cytométrie en flux et leurs valeurs normalisées. Les sérums sont classés en fonction de leurs réactivités normalisées. Tous les sérums dont la valeur est supérieure à 2 sont considérés comme positifs. Les sérums sont classés en fonction de leur valeur de moyenne géométrique normalisée de vert (pas de réactivité) à rouge (très forte réactivité).

Résultats partie IV

Caractérisation de nouvelles molécules d'origine naturelle anti-inflammatoires et/ou immunosuppressives bioactives sur l'endothélium : étude des dérivés de coumarines.

I- Présentation de l'étude.

Les produits d'origine naturelle (PONs : produits naturels (PNs) ou dérivant d'un PN ou dont la structure est inspirée de celle d'un PN) représentent plus de 50 % des médicaments autorisés : leur susceptibilité à interagir avec les cibles thérapeutiques et leur diversité structurale justifient leur étude dans le cadre de la recherche de nouvelles cibles thérapeutiques et de nouveaux médicaments. Les **PONs** constituent donc un bon choix dans le cadre de ce projet visant à **identifier de nouvelles cibles thérapeutiques et de nouveaux médicaments pour lutter contre les rejets de greffe.**

Ce projet, a **l'interface du végétal et de la santé**, consiste à identifier des molécules obtenues par hémisynthèse à partir d'extraits de végétaux, susceptibles de modifier la réponse inflammatoire et immune des cellules endothéliales dans un contexte de transplantation. Pour atteindre ce but final, deux objectifs doivent être atteints :

1/ Sur le plan biologique : développer une analyse simultanée des propriétés anti-inflammatoires, immunosuppressives et vasoprotectrices de molécules sur l'endothélium vasculaire. Pour un actif donné, un grand nombre d'informations sur le phénotype des cellules sera obtenu grâce à une analyse multiparamétrique par cytométrie en flux.

2/ Sur le plan chimique : valoriser ensuite, par criblage bioguidé sur ce test, les plantes médicinales ligériennes (*e.g.* le millepertuis, *Hypericum perforatum*, Hypericaceae) en augmentant la chimiodiversité des actifs par de « bonnes réactions » chimiques mimant notamment les voies de biosynthèse de plantes moins accessibles (*e.g.* Clusiaceae/Calophyllaceae/Hypericaceae endémiques de régions tropicales) dans un contexte de préservation de la biodiversité.

Travaillant depuis plusieurs années à l'isolement de métabolites secondaires synthétisés par les Clusiaceae et les Calophyllaceae, le laboratoire SONAS de l'Université d'Angers a pu enrichir sa chimiothèque en divers polyphénols polyprénylés. Ces composés sont généralement doués de propriétés antioxydantes (Fouotsa *et al.*, 2015) et anti-inflammatoires (Ali *et al.*, 2011 ; Santa-Cecília *et al.*, 2011), et des effets inhibiteurs de molécules d'adhésion telles que VCAM-1 (Chao *et al.*, 2002 ; Tanaka *et al.*, 2001) ont déjà été observés. Les activités immunosuppressives de plusieurs dérivés polyphénoliques ont aussi été démontrées, notamment celles du glycyrol (Li *et al.*, 2010) et de l'isogarcinol (Fu *et al.*, 2014).

Ainsi, plusieurs polyphénols représentatifs des familles chimiques retrouvées dans les extraits de Clusiaceae et de Calophyllaceae ont été sélectionnés (Figure 33), pour une étude de leurs effets sur l'expression de marqueurs endothéliaux de l'inflammation et de l'immunité. Tous les produits testés provenaient de la chimiothèque du laboratoire SONAS (responsable : Dr. Le Ray). Les résultats montraient que les coumarines de type mammea sont prépondérantes dans plusieurs extraits ou fractions au potentiel anti-inflammatoire. Celles-ci semblent donc particulièrement opportunes à étudier, notamment au niveau des relations structure-activité. Ainsi a-t-on choisi de comparer l'effet de sept types de coumarines différemment substituées. Parmi elles, se trouvent trois phénylcoumarines : mammea A/AA (Raad *et al.*, 2006), qui porte une chaîne acyle en position 6 et une unité prényle sur C-8 ; mammea A/AA cyclo F (Raad *et al.*, 2006), dont l'unité prényle est cyclisée avec l'hydroxyle ; et le lépidotol A (Rouger *et al.*, 2015), nouvellement isolé de *Mesua lepidota* et diprényle en position 6. Présentant un substituant différent en position 4, la propylcoumarine cyclisée mammea B/AB cyclo F (Raad *et al.*, 2006) a été choisie, ainsi que deux 1-acétoxypropylcoumarines en mélange, le neurophyllol A et le neurophyllol B (Dang *et al.*, 2014)(17 % et 83 % respectivement), qui sont des dérivés hydroxylés de mammea E. Outre des coumarines de type mammea, deux coumarines simples ont enfin été intégrées au panel : la coumarine et l'ombelliférone uniquement hydroxylée en position 7.

Egalement très retrouvées dans les extraits DCM (DiChloroMéthane) de *Calophyllum* et de *Mesua*, les xanthones prénylées sont ici représentées par la caloxanthone C et la calothwaitesixanthone (Hay *et al.*, 2004), cyclisées de façon linéaire pour la première et angulaire pour la seconde. La benzophénone cage prénylee qu'est la guttiférone J (Merza *et*

al., 2006) a également été incluse dans les tests biologiques en tant qu'acylphloroglucinol polyprénylé (PPAP), tandis que dans la famille des pyranochromanones acides figure l'acide blancoïque, isolé de *Calophyllum tetrapterum* au cours de ce travail de thèse. Enfin, un biflavonoïde simple, l'amentoflavone (Ferchichi *et al.*, 2012), représente ici les polyphénols extraits par le MeOH.

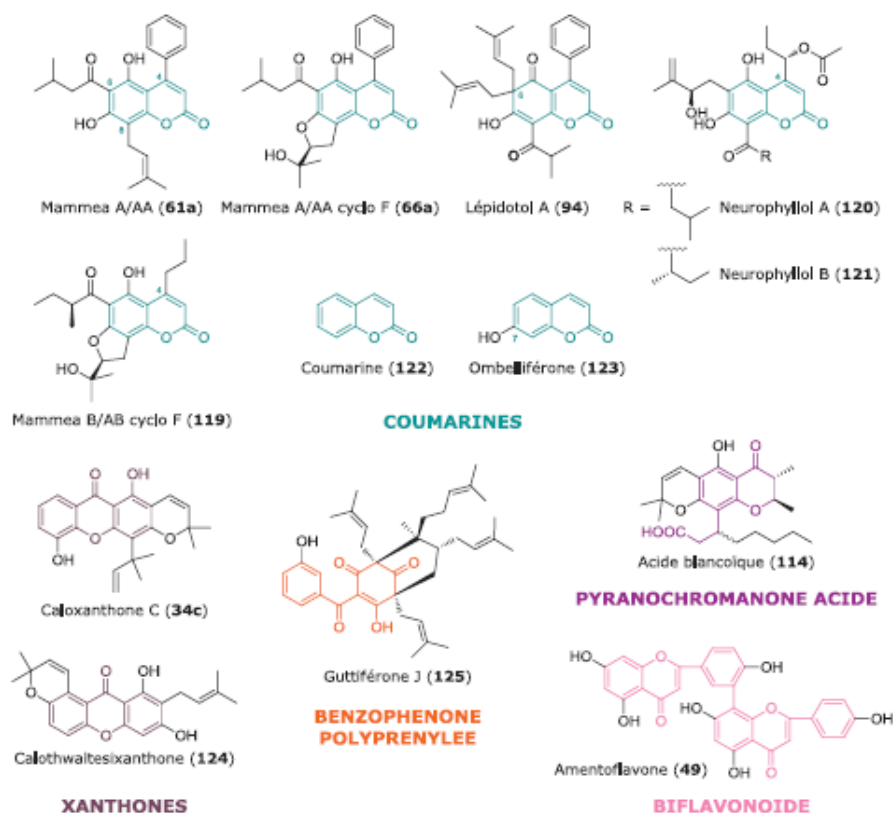


Figure 33 : Composés sélectionnés pour l'étude des effets sur un panel de marqueurs endothéliaux de l'inflammation et de l'immunité.

Au total, ce sont donc 13 composés répartis dans cinq classes de polyphénols qui ont été sélectionnés, en vue d'évaluer leurs effets anti-inflammatoires et immunorégulateurs.

L'activité des composés a été testée en deux étapes successives au moyen tout d'abord d'un test de screening par Elisa sur tapis de cellules endothéliales puis dans un second temps par analyse phénotypique incluant des marqueurs de l'inflammation et de l'immunité réalisées par cytométrie de flux. Les résultats de cette étude sont présentés dans **l'article 3.**

Aticle n°3 :

Prenylated Polyphenols from *Clusiaceae* and *Calophyllaceae* with Immunomodulator Activity on Endothelial Cells

Aticle soumis au journal Plos One

Caroline Rouger¹, Sylvain Pagie^{2,3,4}, Séverine Derbré^{1*}, Anne-Marie Le Ray¹, Pascal Richomme¹ and Béatrice Charreau^{2,3,4*}

¹ Université d'Angers, Campus du végétal, SFR4207 QUASAV, EA921 SONAS, Beaucouzé, France

² INSERM UMR1064, Centre de Recherche en Transplantation et Immunologie, IHU CESTI, LabEx IGO and LabEx Transplantex, Nantes, France

³ CHU de Nantes, Institut de Transplantation-Urologie-Néphrologie, ITUN, Nantes, France

⁴ LUNAM, Université de Nantes, Faculté de Médecine, Nantes, France

Short title: Natural prenylated polyphenols prevent MHC expression

* severine.derbre@univ-angers.fr (SD)

* beatrice.Charreau@univ-nantes.fr (BC)

Abstract

Endothelial cells (ECs) are key players in inflammation and immune responses involved in numerous pathologies. If attempts were experimentally undertaken to prevent and control ECs activation, drug leads and probes still remain necessary. As natural products (NPs) from Clusiaceae and Calophyllaceae plants were previously shown able to prevent endothelial dysfunction, the aim of the present study was to identify more precisely the molecular scaffolds that could limit ECs activation. Therefore 13 polyphenols belonging to 5 different chemical types of secondary metabolites [*i.e.* mammea coumarins, a biflavonoid, a pyranochromanone acid, a polyprenylated polycyclic acylphloroglucinol (PPAP) and two xanthenes] were tested on resting and cytokine-activated EC cultures. Using flow cytometry, quantitative and qualitative changes in the expression of both adhesion molecules (VCAM-1, ICAM-1, E-selectin) and major histocompatibility complex (MHC) molecules allowed us to evaluate their pharmaceutical potentials. 3 mammea coumarins efficiently reduced (up to >90%) both basal and cytokine-regulated levels of MHC class I, class II, MICA and HLA-E on EC surface. They also prevented VCAM-1 induction upon inflammation. From a structural point of view, our results associate the loss of the free prenyl group substituting mammea coumarins with a reduced cellular cytotoxicity but also a cancellation of their anti-inflammatory potential and a reduction of their immunosuppressive effects. A PPAP, guttiferone J, also triggers a strong immunomodulation but restricted to HLA-E and MHC class II molecules. In conclusion, mammea coumarins with a free prenyl group and the PPAP guttiferone J emerged as NPs able to drastically decrease both VCAM-1 and a set of MHC molecules and to potentially reduce the immunogenicity of the endothelium.

Introduction

Located at the interface between blood and tissues, endothelial cells (ECs) lining the vasculature are key cells involved in the control of vascular homeostasis, blood pressure, coagulation, inflammation and leukocyte trafficking [1]. ECs also express classical major histocompatibility complex (MHC) class I and class II molecules which participate in the activation of immune responses [2,3]. Moreover, human ECs also express a specific set of non classical MHC molecules including MHC class I related chain A (MICA) and HLA-E that provide ECs with specific roles in both innate and adaptive immunity [4]. In response to inflammation, ECs become activated and display changes in phenotype and functions. Activated ECs favor inflammation by the expression of adhesion molecules for activated leukocytes and the release of inflammatory soluble mediators such as cytokines and chemokines. Activated ECs promote Natural killer (NK), CD4+ and CD8+ T cell activation and effector functions *via* the upregulation of MHC and MHC-like molecules. EC activation may be transient and reversible or sustained during acute inflammation leading to endothelial cell dysfunction. This pathological state is involved in numerous disorders, including sepsis, cardiovascular diseases and solid organ transplant rejection. Attempts to prevent and control EC activation and dysfunction can be achieved experimentally by the inhibition of signaling pathway such as NFκB by antioxidant compounds [*e.g.* pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC)] [5,6] as well as apoptosis mediator [7] or effector molecules [8]. However drug leads and probes remain necessary in the field. The present study focused on the ability of polyphenols produced by *Clusiaceae* and *Calophyllaceae* plants to prevent endothelial dysfunction.

Indeed natural products (NPs) and their derivatives (NDs) represent more than 50% of drug active ingredients marketed from 1981 to 2014 [9]. These NPs are biosynthesized and used by living organisms for different purposes such as defense against predators or microorganisms. This could explain why NPs and NDs constitute almost the two third of anticancer, immunosuppressive, antibacterial, anticoagulant, antifungal and antiparasitic drugs [9]. As NPs display a large chemodiversity [10], they play a key role in pharmaceutical research: they could be structural leads of new drugs [9] as well as a mean to investigate new biological pathways and to discover new therapeutic targets [11]. In this context, we have been studying the interest of NPs to prevent the endothelial dysfunction since several years: In the previous screening program ProVasc (2009-2013) aiming at identifying NPs or extracts likely to reduce endothelial dysfunction, secondary metabolites from Clusiaceae and Calophyllaceae species emerged as compounds of interest in the field [12,13]. These vegetal species are pantropical trees and shrubs known to biosynthesize phenol derivatives, such as coumarins, xanthones, polyprenylated polycyclic acylphloroglucinols (PPAPs) and biflavonoids [14,15,16]. A number of them are prenylated compounds, which often contributes to increase their biological activities [17]. Several polyphenols isolated from these families have also shown anti-inflammatory [18] or immunosuppressive [19,20] activities and some species are used in folk medicine against inflammatory diseases [21].

Through the present work, before further research on targets and signaling pathways is done, a selection among these polyphenols based on their ability to prevent endothelial dysfunction was expected. Our previous investigations on Clusiaceae and Calophyllaceae species allowed us to build an in-house chemical library which contains dozens of various polyphenols which biological effects could be evaluated [22,23,24]. Monitoring ECs

activation *in vivo* using noninvasive approaches is still limited in human. However culture of primary ECs retain their ability to respond to inflammatory stimuli such as the cytokines TNF and IFN γ regulating a set of cell surface molecules including the adhesion and MHC molecules that could be reliable markers of ECs activation and dysfunction. To select the most promising scaffolds, the inhibitory effect of natural polyphenols was thus tested on resting and cytokine-activated EC cultures. Quantitative and qualitative changes in the expression of both adhesion molecules and MHC molecules were used to establish the anti-inflammatory and immunosuppressive bioactivities of a set of natural compounds. Here, 13 molecules from 5 different chemical types of secondary metabolites (*i.e.* mammea coumarins, a biflavonoid, a pyranochromanone acid, a PPAP and two xanthonnes) were analyzed. Structure activity relationships were further investigated for various mammea coumarins.

Materials and Methods

Chemicals

Coumarin (**1**) and umbelliferone (**2**) were purchased from Sigma-Aldrich (St Quentin Fallavier, France).

The Chemical Library

Other tested NPs were chosen from the in-house chemical library of the laboratory which includes 139 prenylated polyphenols isolated from Clusiaceae and Calophyllaceae species. The extraction and purification or synthesis procedures of mammea A/AA (**3**), mammea A/AA cycloF (**4**), neurophyllols B (**5**) and A (**6**), mammea B/AB cycloF (**7**), lepidotol A (**8**), amentoflavone (**9**), blancoic acid (**10**), guttiferone J (**11**), caloxanthone C (**12**) and calothwaitesixanthone (**13**) have been previously described [12,13,25,26,27,28] (**Fig. 1**). Their purity was evaluated using high performance liquid chromatography (HPLC). HPLC analysis were performed on a Waters 2695 apparatus (Waters, Guyancourt, France) consisting of a pumping system, a vacuum degasser and a DAD detector, assisted by the Empower 2 software (Waters). A 10 μ L sample (1 mg/mL) was directly injected onto a Lichrospher 100 RP18 column (150 $\times$ 4.6 mm, 5 μ m, Agilent Technologies) using a water/acetonitrile system. The mobile phase was as follows: Water/ACN from 95:5 to 0:100 v/v in 40 min and 0:100 for 5 min. The flow rate was 1 mL/min. UV detection were achieved at 210 nm and λ_{max} for each NP. Sample purities were beyond 80% at both wavelengths. A stock solution was prepared: each compound was solubilized in dimethylsulfoxide (DMSO, Fisher Scientific, Illkirch, France) at a concentration of 10 mM and further diluted in culture medium to afford 1000X. The final concentrations from 0.5 to 100 μ M (ELISA and MTT

assays) and 10 μ M (flow cytometry) were reached by dilution 1/1000 in the culture medium. Therefore the final DMSO percentage was below 0.1%.

Endothelial Cell Culture and Activation

Primary human HUVEC (Lonza Verviers SPRL, Verviers, Belgium) were maintained with endothelial cell basal medium (ECBM, PromoCell, Heidelberg, Germany) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), 4 μ L/mL endothelial cell growth supplement/heparin, 0.1 ng/mL human epithelial growth factor, 1 ng/mL human basic fibroblast growth factor, 1 μ g/mL hydrocortisone (C-39210, PromoCell), 2 mM glutamine, 100 U/mL penicillin and 100 μ g/mL streptomycin (Life Technologies, Cergy Pontoise, France). HUVEC from 3 independent donors were used for the assays. For activation, ECs were grown to confluence in 6-well or 12-well plates and starved overnight in ECBM supplemented with 2% FCS. Then, cells were preincubated with each compound for 1h or 18h (zoledronic acid, ZA, Sigma-Aldrich) at 10 μ M or 200 μ M for PDTC (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA), prior to activation with TNF (200 U/mL, 6h) or IFN γ (100 U/mL, 48h) both purchased from R&D Systems (Lille, France). Experiments were also performed without cytokines to evaluate the effect on the constitutive expression of the cell surface molecules.

Cell Viability Assay

Cell viability was measured by MTT reduction assay. Briefly, human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were cultured to confluence in 96-well plates and treated for 48h with each prenylated polyphenol (from 0.5 to 100 μ M), or when applicable, immunosuppressive drugs CsA (Sandimmun® 50 mg/mL, Novartis Pharma SAS, Rueil-

Malmaison, France) or ZA (Sigma-Aldrich) at 10 μ M or cytotoxicity control glyoxal (Sigma-Aldrich) at 4 mM. Then, culture medium was removed and cells were incubated with 1 mg/mL MTT (Sigma-Aldrich) for 3h at 37 °C. The formazan crystals produced were dissolved in DMSO and the absorbance was measured at 570 nm. Assays were performed in triplicate.

Cellular Elisa for VCAM-1

ECs were plated in 96-well plates (1.10^4 cells/well) and cultured overnight to reach confluency. Confluent monolayers were then preincubated with prenylated polyphenols (from 0.5 to 100 μ M) or with pharmacological inhibitor of VCAM-1 induction (PDTC, 200 μ M) before stimulation with or without TNF (100 U/mL) for 6h. After treatment cells were fixed and VCAM-1 proteins were detected using anti-VCAM-1 mouse monoclonal antibodies (10 μ g/mL) and revealed using horseradish peroxidase-labelled secondary antibodies. Experiments were performed in triplicates and repeated in three independent assays.

Immunostaining and Flow cytometry

ECs were plated in 96-well plates (1.10^4 cells/well) and cultured overnight to reach confluency. Confluent monolayers were then preincubated with prenylated polyphenols (10 μ M) or with pharmacological inhibitor of VCAM-1 induction (PDTC, 200 μ M) before stimulation with or without TNF (100 U/mL) for 6h. Cells were immunostained using anti-VCAM-1, anti-hE/P-selectin, anti-hICAM-1-FITC (R&D Systems), anti-pan HLA class I (anti-HLA-A, -B and -C; clone W6/32), anti-pan HLA class II (anti-HLA-DR,-DP,-DQ; clone L243), anti-MICA (clone AMO1) (BamOmab, Tübingen, Germany), anti-HLA-E-APC (clone 3D12) (Miltenyi Biotec, Paris, France) mouse IgGs and anti-mouse IgG + IgM (H+L)-FITC (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA) antibodies. An isotype-matched IgG

was used as a non-specific control and binding of antibodies to the cells was evaluated by flow cytometry using 10 000 cells/sample and a BD FACSCanto™ II flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). Data were analyzed with FlowJo software (Tree Star, Inc., Ashland, OR, USA) and depicted in histograms plotting geometric fluorescence intensity (GFI) on a four-decade logarithmic scale (x-axis) versus cell number (y-axis).

Statistical Analysis

Each experiment was performed at least in triplicate. Data were expressed as means $\pm$ SD and compared using the nonparametric Kruskal-Wallis test with Dunn's multiple comparison post-test. A p value of ≤ 0.05 was considered significant. One, two and three asterisks (*, ** and ***) denote $p < 0.5$, 0.01 and 0.001, respectively.

Results

Selection of natural prenylated polyphenols from *Clusiaceae* and *Calophyllaceae* plants

Thirteen NPs (**1-13**) associated with 5 different chemical types of Clusiaceous and Calophyllaceous secondary metabolites were selected for the study. They were chosen in our in-house chemical library considering their structure, purity and availability. **1-13** include a set of mammea coumarins (**1-8**), a biflavonoid (**9**), a pyranochromanone acid (**10**), a polyprenylated polycyclic acylphloroglucinol (PPAP) (**11**) and two xanthenes (**12-13**) (**Fig 1**[Erreur ! Source du renvoi introuvable.](#)). Since mammea coumarins (**3-8**, $R_2=R_4=OH$ or O) isolated from *Clusiaceae* and *Calophyllaceae* plants were previously described as promising compounds in this field [26,29], their structure activity relationships were indeed more thoroughly investigated here. Coumarins were chosen in the library according to their substituents: R_1 is either a phenyl (**3-4,8**), a 1-(acetoxy)-propyl (**5-6**) or a propyl (**7**) group; these coumarins carry an acyl in R_3 and a prenyl in R_5 (**3-4,7**) or *vice versa* (**5-6,8**); finally the prenyl group may be cyclized (**4,7**) or not (**3,5-6,8**). To investigate the bioactive potential of mammea coumarins in comparison with simple derivatives, coumarin (**1**) and umbelliferone (**2**) were also tested.

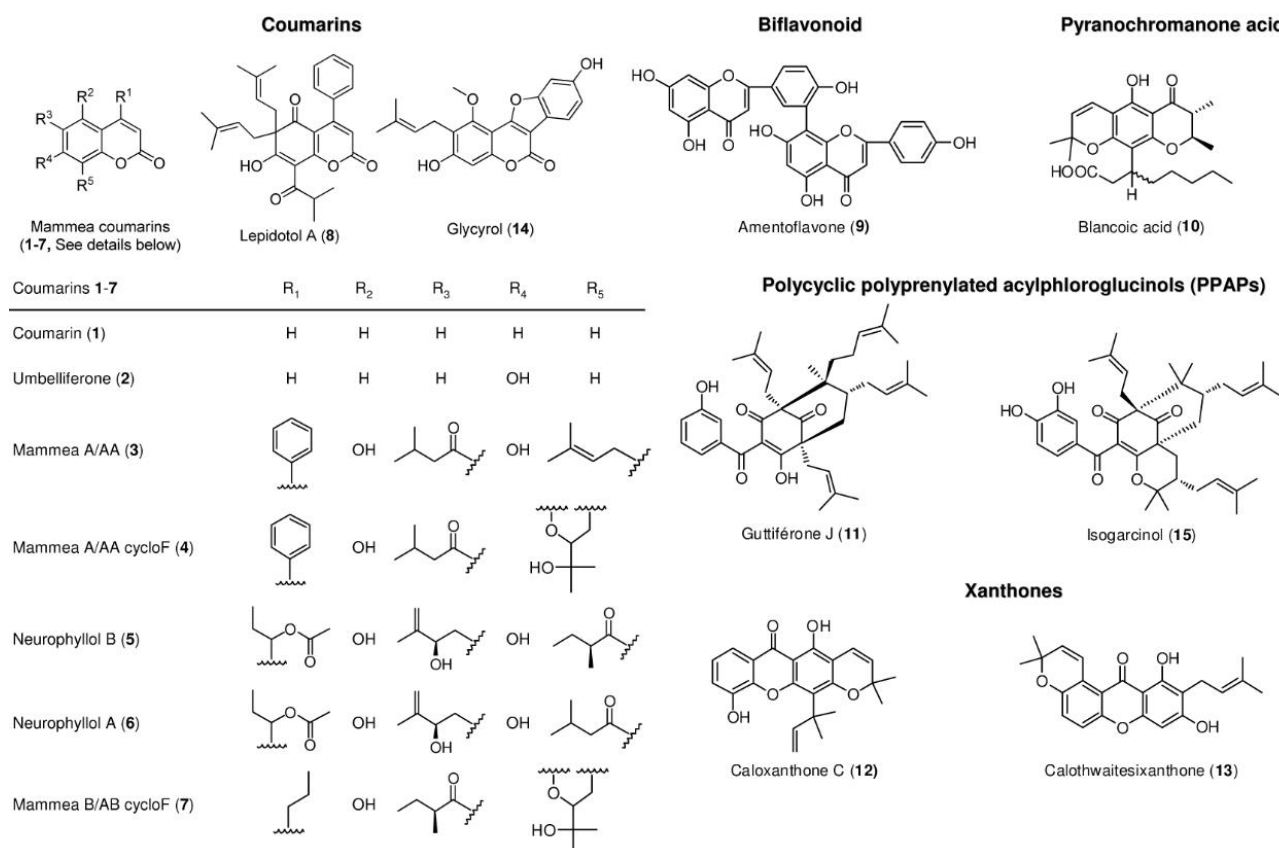


Fig 1. Names, structures and chemical types of prenylated polyphenols 1-15.

Screening based on cytotoxic activity and inhibition of VCAM-1 using ELISA

Firstly, as a screening step, **1-13** were tested for cytotoxicity toward EC cultures and for their ability to inhibit TNF-induced expression of the adhesion molecule VCAM-1 on cell surface. To this aim EC monolayers were incubated with or without TNF for in the presence of NPs. Pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC) a potent inhibitor of NFκB [5] and a transcription factor involved in VCAM-1 expression, was used as a positive control. After treatment, cell viability was assessed using a MTT assay while, in parallel experiments, VCAM-1 expression was revealed using an indirect two-step immunostaining protocol. For each NPs, 3 concentrations (ranging from 0.5 to 100 μM) were tested. As a result, selected natural xanthones, *i.e.* caloxanthone C (**12**) and calothwaitesixanthone (**13**), were found as toxic

towards ECs and thus were not further investigated using flow cytometry. The other NPs were either nontoxic or displayed a moderate (<25%) toxicity only at the higher concentration tested (50-100 μ M) (**Fig S1 A**). Concerning the effect on VCAM-1, most of the tested NPs exhibited an inhibitory effect ranging from 20% to 60% (**Fig S1 B**), the best effect being found for coumarin mammea A/AA (**3**). As expected, effects observed for compounds **12** and **13** resulted from cytotoxic effect on ECs. As both cyclized cycloF mammea coumarins (**4** and **7**) exhibited identical activities, only one of them, mammea A/AA cycloF (**4**), was included in the following steps using flow cytometry.

Guttiferone J and mammea coumarins inhibit the vascular adhesion molecule VCAM-1 on endothelial cells upon inflammation

After this preliminary screening, 10 natural polyphenols (**1-6**, **8-11**) were finally selected to further characterize their bioactivity on a set of inflammatory and immune molecules regulated in human vascular ECs upon inflammation. These qualitative and comparative analyses were performed using flow cytometry. In comparison with cellular ELISA, flow cytometry allows the relative quantification of several markers on the same cell. In our case, an analysis of 7 inflammatory (VCAM-1, ICAM-1, E-selectin) and immune markers (MHC class I, HLA-E, MICA, MHC class II) was achieved. Anti-inflammatory and immunomodulatory activities of the simple coumarins **1-2** as well as the prenylated polyphenols **3-6** and **8-11** were assessed by measuring inflammatory and immune mediators surface-expression induced by TNF or IFN γ , respectively (**Fig 2**). All NPs were tested at the same concentration (10 μ M) to ensure comparison. Toxicity of the compounds at 10 μ M for ECs cultures was also evaluated (**Fig 3**). Simple coumarins **1-2** had no toxic effects on ECs whereas the mammea coumarins **3-8** exhibited variable cytotoxicities at 10 μ M. Indeed, the prenylated coumarins mammea A/AA (**3**) and neurophyllol B (**5**)/neurophyllol A (**6**) (83/17 mixture) decreased the

cell viability at 10 μ M, whereas no reduction in cell viability was observed with mammea A/AA cycloF (**4**) and lepidotol A (**8**). This result suggests a “protective effect” of the cyclization occurring between the substituents R₄ and R₅ in mammea coumarins, which is consistent with the literature data [30]. The cell toxicities induced by amentoflavone (**9**) and blancoic acid (**10**) were not significant. Finally, similarly to coumarin mammea A/AA (**3**) and neurophyllols (**5-6**), the PPAP guttiferone J (**11**) also impacted the cell viability.

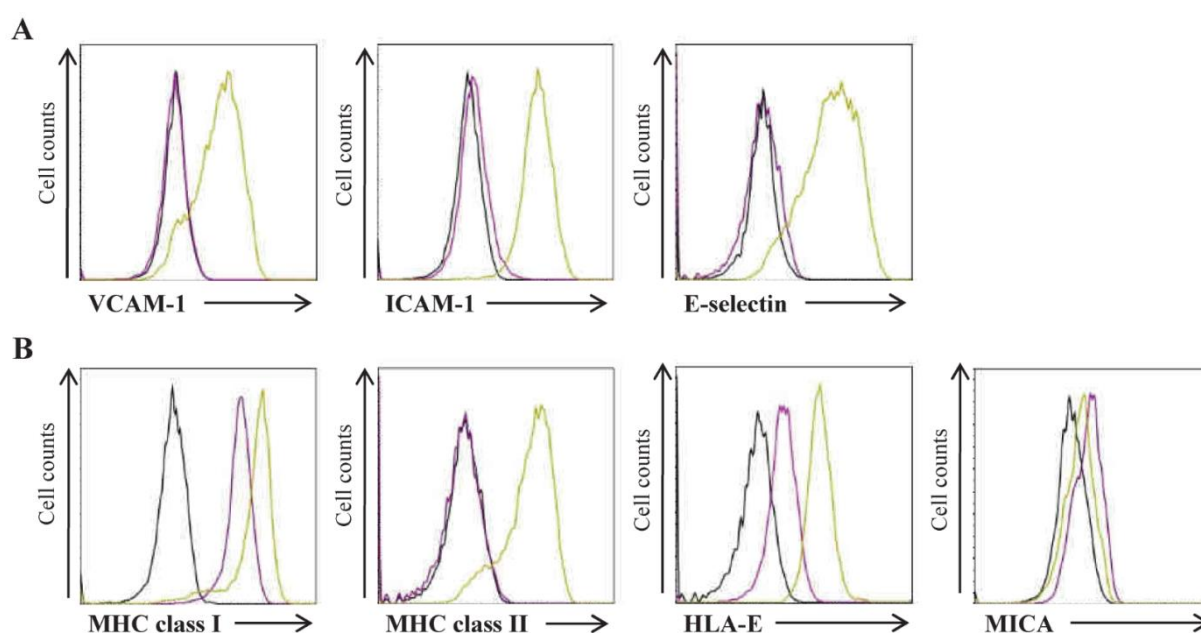


Fig 2. Representative fluorescence-activated cell sorting (FACS) histograms showing constitutive *versus* induced expression of inflammatory and immune molecules at the cell surface of ECs. Histograms show the intensity of fluorescence (log) for untreated (purple line) and cytokine-treated (green line) ECs analyzed by flow cytometry. Immunostaining using isotype-matched IgG (dark line) was used as a control. (A) Basal *versus* TNF-induced expression of VCAM-1, ICAM-1 and E-selectin after a 6h incubation. (B) Basal *versus* IFN γ -modulated expression of MHC class I, MHC class II, HLA-E and MICA.

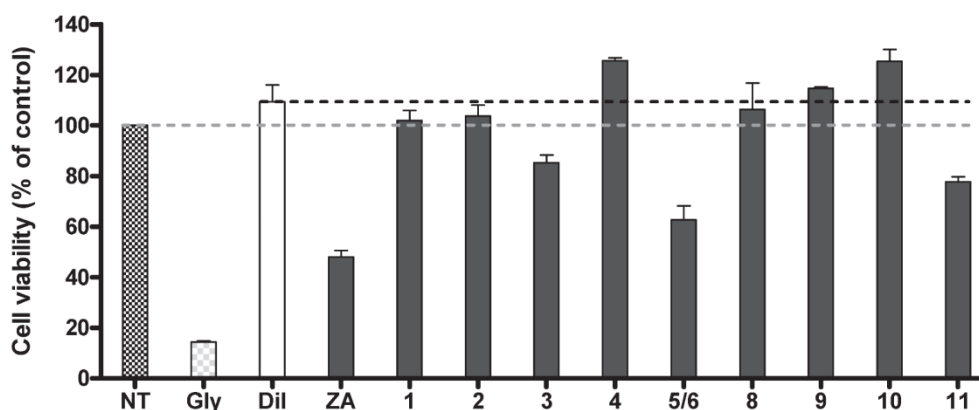


Fig 3 . Effect of compounds 1-6 and 8-11 (10 μ M) on cell viability. A diluent (Dil) control is used (dilution of DMSO at 1/1000 – dark dashed line), as well as a non-treated (NT) control – grey dashed line – and the cytotoxicity control glyoxal (Gly) at 4 mM. The cytotoxic activity of the immunosuppressive drug zoledronic acid (ZA) was also assayed.

The ability of natural polyphenols to inhibit the expression of three adhesion molecules VCAM-1, ICAM-1 and E-selectin on activated ECs was assessed using flow cytometry after ECs treatment with TNF. PDTC was used as a positive control. Experiments were also performed without TNF to exclude any potential proinflammatory effect. No increase in the basal expression was observed in presence of the tested NPs indicating no pro-inflammatory activity for these polyphenols (Fig S2). Our findings (Fig 4) revealed that active prenylated polyphenols especially inhibited VCAM-1 expression. A PPAP, guttiferone J (11) and some mammea coumarins, i. e. 3, 5/6 (83/17) and 8, significantly suppressed VCAM-1 expression when compared with TNF alone. On the other hand, simple coumarins 1-2 and mammea A/AA cycloF (4) did not exhibit any inhibitory activity, suggesting that substitution of the coumarin skeleton was a necessary condition for anti-inflammatory activity, whereas an additive cyclization between R4 and R5 in mammea coumarins cancelled this inhibitory potential. Expression of ICAM-1 was only significantly decreased by 23% by coumarin 8, whereas all tested NPs had no action on E-selectin expression. At 10 μ M, amentoflavone (9), a common biflavonoid in Clusiaceae and Calophyllaceae species and

blancoic acid (10), a pyranochromanone acid, did not modulate the expression of the inflammatory markers.

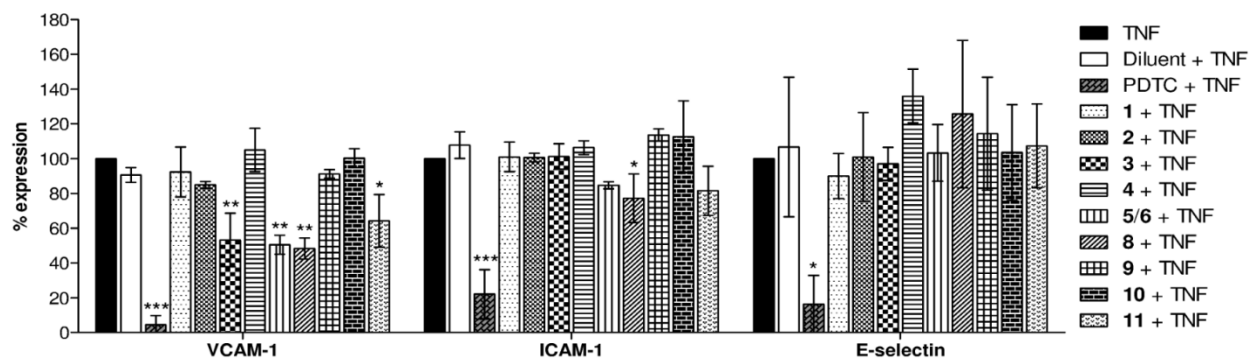


Fig 4. Effect of compounds 1-6 and 8-11 (10 µM) on TNF-induced expression of inflammatory molecules in ECs. Each bar represents mean ± SD of three to five independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ compared with medium or TNF control group. Pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC) was used at 200 µM as the inhibition control.

Guttiferone J and mammea coumarins are potent inhibitors of MHC expression

ECs coexpress adhesion molecules and a broad array of MHC molecules including the MHC-like molecules MICA and HLA-E [4]. Consequently, ECs are suitable candidates for drug testing strategy aiming to identify bioactive compounds with either broad or selective effects on leukocyte adhesion and/or leukocyte activating immune molecules. Importantly, whereas inflammatory molecules are responsive to TNF, MHC class I (HLA-A,-B,-C) and class II (HLA-DR, DP, -DQ) molecules are upregulated by the cytokine IFN γ , with the exception of MICA which is downregulated by IFN γ [31]. The bisphosphonate zoledronic acid (ZA) previously reported as acting on immunity [32] was used as a control. The immunosuppressive drug and calcineurin inhibitor cyclosporin A (CsA) [33] was also tested. The immunomodulatory potential of NPs **1-6** and **8-11** was first studied by measuring the effect on the constitutive surface-expression of MHC molecules after a short (1h) or a long term (48h) treatment. After

1h (**Fig 5A**), we observed that only mammea coumarins **3**, **5/6** and **8** had a slight but significant inhibitory effect on basal HLA-E (30% of inhibition) and MICA (<20%). No effect was found for MHC class I molecules. Their regulatory effect was enhanced after 48h of treatment (**Fig 5B**) with a major effect on HLA-E (up to 90% of inhibition) and MICA (up to 60% of inhibition) while a slight but significant effect was also observed for MHC class I molecules for mammea coumarins **3** and **5/6**. After 48h (**Fig 5B**), ZA, the reference compound, significantly inhibited MHC class I, HLA-E and MICA on ECs. Interestingly, mammea A/AA cyclo F (**4**) seemed also effective although inhibitions were not found significant except for HLA-E at 48h. In addition to these effects observed for mammea coumarins, we observed that the PPAP, guttiferone J (**11**), also strongly reduced HLA-E after 48h.

MHC molecules class I, class II and HLA-E are readily upregulated on ECs in response to IFN γ (**Fig 5C**). In these conditions, ZA and the tested polyphenols were not able to reduce the upregulation of MHC class I molecules. ZA displayed no significant effect on HLA-E, MICA and MHC class II in the presence of IFN γ although a trend toward inhibition was observed. In contrast, mammea coumarins **3**, **5/6** and **8** and guttiferone J (**11**) were potent inhibitors of MHC class II induction mediated by IFN γ . Moreover, mammea coumarins and guttiferone J were also potent inhibitors of the upregulation of HLA-E by IFN γ that preserve HLA-E level close to the basal level. Interestingly, mammea coumarins **3**, **4** and **5/6** potentiate the inhibition of MICA in response to IFN γ , leading to an overall >90% decrease compare to basal level.

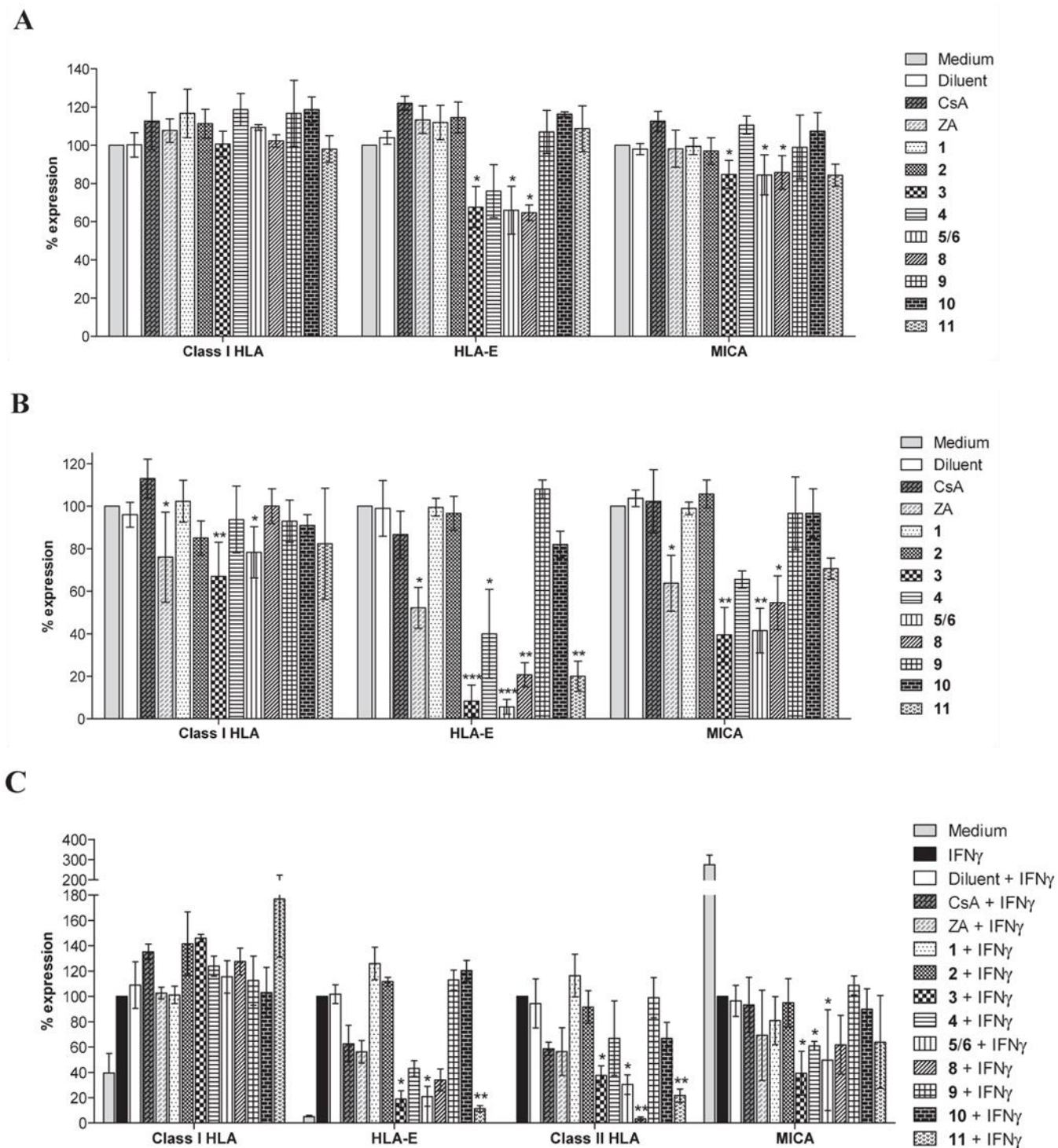


Fig 5. Immunomodulatory activities in ECs. Each bar represents mean $\pm$ SD of three to five independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ compared with medium or IFN γ control group. (A) Effect of compounds 1-6 and 8-11 (10 μ M) on the basal expression of immune markers after a 1h incubation. (B) Effect of compounds 1-6 and 8-11 (10 μ M) on the basal expression of immune markers after a 48h incubation. (C) Effect of compounds 1-6 and 8-11 (10 μ M) on IFN γ -induced expression of immune markers. Cyclosporin (CsA) and zoledronic acid (ZA) were used as immunosuppressive references at 10 μ M.

Discussion

Among thirteen polyphenols tested during this study, mammea coumarins and PPAPs such as guttiferone J (**11**), usually isolated from *Clusiaceae* and *Calophyllaceae* species, emerged as NPs with a molecular scaffold able to modulate expression of immune as well as inflammation markers on ECs. In particular, a major result from this study is the profile of markers inhibited by the mammea coumarins: Coumarins **3**, **5/6**, and **8** efficiently reduce both basal and cytokine-regulated levels of MHC class I and class II, MICA and HLA-E on EC surface up to >90% for MHC class II, HLA-E and MICA. The molecular scaffold of PPAPs emerges from the study as well: Guttiferone J (**11**) also triggers a strong immunomodulation but restricted to HLA-E and MHC class II molecules. The concomitant inhibition of VCAM-1, the ligand for VLA4 on activated leukocytes, suggests that both mammea coumarins and guttiferone J act on two steps of EC/leukocyte interaction (1) by preventing the firm adhesion of activated leukocytes on the endothelium, a prerequisite step for extravasation in the tissue and (2) by inhibiting the direct interaction with a set of immunoreceptors $\alpha\beta$ T cell receptor cells, NKG2D and CD94/NKG2A/C (**Fig 6**).

In contrast to MHC class I, MHC class II, HLA-E and MICA are expressed only by a restricted set of cells which includes mostly cells involved in immunity such as antigen presenting cells (ECs, monocytes, dendritic cells) and lymphocytes [34,35]. Among them, ECs coexpress MHC class I, MHC class II, HLA-E and MICA. MHC class I and class II are masterpieces of adaptive immune responses triggering antigen-specific CD8⁺ and CD4⁺ T cell activation, respectively.

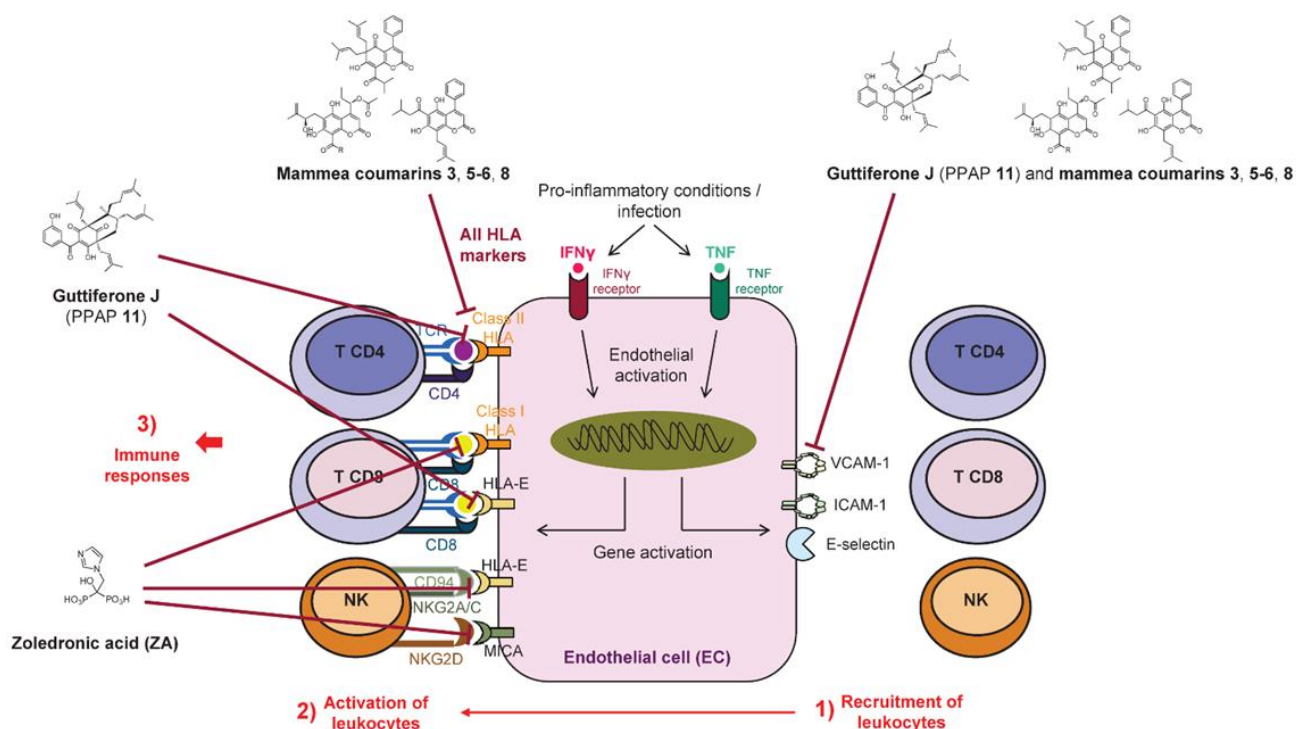


Fig 6. Overview and hypothesis. Inflammatory and immune mediators expressed on EC surface in response to pro-inflammatory cytokines and involved in graft rejection

HLA-E and MICA play more complex roles as ligands for inhibitor and activating receptors (CD94/NKG2A and NKG2D, respectively) providing control for NK cells activation and costimulation of CD8⁺ T cells [4,36,37]. MICA and HLA-E have key functions in the immune responses against cancer, infection and allogeneic solid organ transplant [38]. Moreover, MICA and HLA-E also play different or even opposite role according to the pathologic context. Consequently, for the moment, further studies are required to determine whether the reduction of MHC can be achieved *in vivo* and in which model/pathology it could provide clinical benefit. Mammea coumarin as well as PPAPs selected in this work could help achieve this goal.

Only statins were previously reported to decrease MHC class II molecules, a process due to inhibition of the inducible promoters I and IV of the transactivator CIITA and observed in several cell types, including primary human ECs and monocyte-macrophages [39]. In

contrast, the effect of statins on MHC class I remains controversy probably due to both cell type-specific and statin-specific effects. Statins are well-known hydroxy-methylglutaryl-CoA (HMG-CoA) reductase inhibitors which prevent the biosynthesis of cholesterol but also the production of isoprenoid intermediates such as geranyl-geranyl pyrophosphate (GGPP) and farnesyl pyrophosphate (FPP). GGPP and FPP are crucial for the post-translational modifications of proteins such as the small GTP-binding proteins Ras, Rac, and Rho. [40]. As this isoprenylation step is essential for various cellular functions, the inhibition of the mevalonate pathway by statins could explain their pleiotropic effects [8]. They potentiate IFN γ -induced MHC class I expression in tumor cell lines [41] but reduce both basal and inducible expression in primary muscle cell line [42]. In human ECs, contrary to the study of Kwak *et al* [39], Belliard *et al* reported that statins upregulate IFN γ -induced MHC class I [43]. Although the mechanisms remain unclear, statins might affect cytokine induced expression of STAT1 and the expression of proteins involved in class I antigen presentation (TAP and LMP) [42]. Statins were also found to increase MICA expression on melanoma cells *in vitro* and melanoma growth as well as pulmonary metastases in mice [44].

Our findings also support a new role for the bisphosphonate ZA in immune modulation through a regulatory action of a set of MHC molecules including MHC class I, HLA-E and MICA. In our conditions, the effect of ZA appeared for *in vitro* long term (48h) treatment suggesting that ZA may affect protein turn over and/or *de novo* synthesis. ZA belongs to aminobisphosphonates (NBPs), an important class of molecules with different molecular mechanisms of action used in the treatment of bone diseases [45]. ZA is a very potent inhibitor of farnesyl-pyrophosphate synthase (FPP), an enzyme acting downstream from HMG-CoA reductase, the rate-limiting enzyme in the mevalonate pathway. Recently,

immunomodulation of $\gamma\delta$ T lymphocytes has been reported for ZA associated with anti-tumor activity [32] in addition to its previously described anti-angiogenic, anti-metalloproteinase or pro-apoptotic activities [45]. From the best of our knowledge our study provides the first description of an immunomodulation targeting MHC expression for NBPs. Nevertheless, at equal concentration, our results established mammea coumarins **3,5/6** and **8** as well as the PPAP guttiferone J (**11**) as more potent MHC modulators when compared with ZA.

Mechanism of MHC regulation mediated by the prenylated polyphenols studied still remains to be elucidated. Mammea coumarins were active, simple coumarins were not. If a substituent at C-4 appeared as a necessary condition, the nature of this substituent (*i.e.* phenyl, alkyl, 1-acetoxypropyl) did not influence on their effects. Although cyclized mammea coumarins such as mammea A/AA cycloF (**4**) are less cytotoxic on ECs, this cyclization seemed to reduce activities. The presence of a prenyl substituent oxidised or not, thus appeared as essential. Previously glycyrol (**14**), another prenylated coumarin, was described as a calcineurin inhibitor and also emerged as a potential immunomodulatory drug [29,46]. Similar effects on both immune and inflammatory mediators were observed with the PPAP **11** as well. Since isogarcinol (**15**), another PPAP was recently described as a potent immunosuppressive agent acting as a calcineurin inhibitor [19,47], a structure activity relationships study of a larger panel of PPAPs would probably be useful.

In conclusion, prenylated coumarins exhibiting a prenyl substituent and the PPAP guttiferone J (**11**) show anti-inflammatory and immunosuppressive activities on cell surface markers. This suggests a common mechanism of regulation of these markers and, consequently, a high therapeutic value for these natural prenylated polyphenols. Such

secondary metabolites from Clusiaceae and Calophyllaceae species thus appear as promising model compounds to develop new immunomodulators through the identification of their biological targets.

References

1. Aird WC (2008) Endothelium in health and disease. *Pharmacol Rep* 60: 139-143.
2. Choi J, Enis DR, Koh KP, Shiao SL, Pober JS (2004) T lymphocyte-endothelial cell interactions. *Annu Rev Immunol* 22: 683-709.
3. Pober JS, Tellides G (2012) Participation of blood vessel cells in human adaptive immune responses. *Trends Immunol* 33: 49-57.
4. Gavlovsky PJ, Tonnerre P, Guitton C, Charreau B (2016) Expression of MHC class I-related molecules MICA, HLA-E and EPCR shape endothelial cells with unique functions in innate and adaptive immunity. *Hum Immunol*.
5. Khachigian LM, Collins T, Fries JW (1997) N-acetyl cysteine blocks mesangial VCAM-1 and NF-kappa B expression in vivo. *Am J Pathol* 151: 1225-1229.
6. Cook-Mills JM, Marchese ME, Abdala-Valencia H (2011) Vascular Cell Adhesion Molecule-1 expression and signaling during disease: Regulation by reactive oxygen species and antioxidants. *Antioxid Redox Signal* 15: 1607-1638.
7. Zhang Y, Pan Y, Bian Z, Chen P, Zhu S, et al. (2016) Ceramide production mediates aldosterone-induced human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) damages. *PLoS ONE* 11: e0146944.
8. Bedi O, Dhawan V, Sharma PL, Kumar P (2016) Pleiotropic effects of statins: new therapeutic targets in drug design. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 389: 695-712.
9. Newman DJ, Cragg GM (2016) Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. *J Nat Prod*.
10. Dobson CM (2004) Chemical space and biology. *Nature* 432: 824–828.
11. Schmitt EK, Hoepfner D, Krastel P (2016) Natural products as probes in pharmaceutical research. *J Ind Microbiol Biotechnol* 43: 249-260.
12. Ferchichi L, Derbré S, Mahmood K, Touré K, Guilet D, et al. (2012) Bioguided fractionation and isolation of natural inhibitors of advanced glycation end-products (AGEs) from *Calophyllum flavoramulum*. *Phytochemistry* 78: 98-106.
13. Dang BT, Geny C, Blanchard P, Rouger C, Richomme P, et al. (2014) Advanced glycation inhibition and protection against endothelial dysfunction induced by coumarins and procyanidins from *Mammea neurophylla*. *Fitoterapia* 96: 65-75.
14. Cechinel FV, Meyre-Silva C, Niero R (2009) Chemical and pharmacological aspects of the genus *Calophyllum*. *Chemistry & Biodiversity* 6: 313-327.

15. Magadula JJ (2012) Bioactive mammea-type coumarins and benzophenones from two clusiaceae plants. *J Pharm Sci Innovation* 1: 31-33.
16. Dang BT, Guitton Y, Freuze I, Grovel O, Litaudon M, et al. (2015) Dereplication of *Mammea neurophylla* metabolites to isolate original 4-phenylcoumarins. *Phytochemistry Letters* 11: 61-68.
17. Yazaki K, Sasaki K, Tsurumaru Y (2009) Prenylation of aromatic compounds, a key diversification of plant secondary metabolites. *Phytochemistry* 70: 1739-1745.
18. Santa-Cecilia FV, Freitas LAS, Vilela FC, Veloso CdC, da Rocha CQ, et al. (2011) Antinociceptive and anti-inflammatory properties of 7-epiclusianone, a prenylated benzophenone from *Garcinia brasiliensis*. *European Journal of Pharmacology* 670: 280-285.
19. Cen J, Shi M, Yang Y, Fu Y, Zhou H, et al. (2013) Isogarcinol is a new immunosuppressant. *PLoS One* 8: e66503.
20. Dang BT, Rouger C, Litaudon M, Richomme P, Séraphin D, et al. (2015) Identification of minor benzoylated 4-phenylcoumarins from a *Mammea neurophylla* bark extract. *Molecules* 20: 17735-17746.
21. de Melo MS, Quintans JdS, Araujo AA, Duarte MC, Bonjardim LR, et al. (2014) A systematic review for anti-inflammatory property of *Clusiaceae* family: a preclinical approach. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2014: 960258.
22. Morel C, Dartiguelongue C, Youhana T, Oger J-M, Seraphin D, et al. (1999) New coumarins from *Mesua racemosa*: isolation and synthesis. *Heterocycles* 51: 2183-2191.
23. Guilet D, Helesbeux J-J, Seraphin D, Sevenet T, Richomme P, et al. (2001) Novel Cytotoxic 4-Phenylfuranocoumarins from *Calophyllum dispar*. *Journal of Natural Products* 64: 563-568.
24. Gomez-Verjan J, Gonzalez-Sanchez I, Estrella-Parra E, Reyes-Chilpa R (2015) Trends in the chemical and pharmacological research on the tropical trees *Calophyllum brasiliense* and *Calophyllum inophyllum*, a global context. *Scientometrics* 105: 1019-1030.
25. Raad I, Terreux R, Richomme P, Matera E-L, Dumontet C, et al. (2006) Structure-activity relationship of natural and synthetic coumarins inhibiting the multidrug transporter P-glycoprotein. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 14: 6979-6987.
26. Rouger C, Derbre S, Charreau B, Pabois A, Cauchy T, et al. (2015) Lepidotol A from *Mesua lepidota* inhibits inflammatory and immune mediators in human endothelial cells. *Journal of Natural Products* 78: 2187-2197.
27. Merza J, Mallet S, Litaudon M, Dumontet V, Seraphin D, et al. (2006) New cytotoxic guttiferone analogues from *Garcinia virgata* from New Caledonia. *Planta Medica* 72: 87-89.
28. Hay A-E, Helesbeux J-J, Duval O, Labaied M, Grellier P, et al. (2004) Antimalarial xanthenes from *Calophyllum caledonicum* and *Garcinia vieillardii*. *Life Sciences* 75: 3077-3085.

29. Li J, Tu Y, Tong L, Zhang W, Zheng J, et al. (2010) Immunosuppressive activity on the murine immune responses of glycyrol from *Glycyrrhiza uralensis* via inhibition of calcineurin activity. *Pharmaceutical Biology* 48: 1177-1184.
30. Reyes-Chilpa R, Estrada-Muniz E, Ramirez AT, Amekraz B, Aumelas A, et al. (2004) Cytotoxic effects of mammea type coumarins from *Calophyllum brasiliense*. *Life Sciences* 75: 1635-1647.
31. Chauveau A, Tonnerre P, Pabois A, Gavlovsky PJ, Chatelais M, et al. (2014) Endothelial cell activation and proliferation modulate NKG2D activity by regulating MICA expression and shedding. *J Innate Immun* 6: 89-104.
32. Muraro M, Mereuta OM, Carraro F, Madon E, Fagioli F (2007) Osteosarcoma cell line growth inhibition by zoledronate-stimulated effector cells. *Cellular Immunology* 249: 63-72.
33. Survase SA, Kagliwal LD, Annapure US, Singhal RS (2011) Cyclosporin A - A review on fermentative production, downstream processing and pharmacological applications. *Biotechnology Advances* 29: 418-435.
34. Zwirner NW, Fernandez-Vina MA, Stastny P (1998) MICA, a new polymorphic HLA-related antigen, is expressed mainly by keratinocytes, endothelial cells, and monocytes. *Immunogenetics* 47: 139-148.
35. Coupel S, Moreau A, Hamidou M, Horejsi V, Souillou JP, et al. (2007) Expression and release of soluble HLA-E is an immunoregulatory feature of endothelial cell activation. *Blood* 109: 2806-2814.
36. Braud VM, Allan DS, O'Callaghan CA, Soderstrom K, D'Andrea A, et al. (1998) HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature* 391: 795-799.
37. Zou Y, Stastny P (2010) Role of MICA in the immune response to transplants. *Tissue Antigens* 76: 171-176.
38. Schrambach S, Ardizzone M, Leymarie V, Sibilia J, Bahram S (2007) In vivo expression pattern of MICA and MICB and its relevance to auto-immunity and cancer. *PLoS One* 2: e518.
39. Kwak B, Mulhaupt F, Myit S, Mach F (2000) Statins as a newly recognized type of immunomodulator. *Nat Med* 6: 1399-1402.
40. Greenwood J, Steinman L, Zamvil SS (2006) Statin therapy and autoimmune disease: from protein prenylation to immunomodulation. *Nat Rev Immunol* 6: 358-370.
41. Tilkin-Mariame AF, Cormary C, Ferro N, Sarabayrouse G, Lajoie-Mazenc I, et al. (2005) Geranylgeranyl transferase inhibition stimulates anti-melanoma immune response through MHC Class I and costimulatory molecule expression. *FASEB J* 19: 1513-1515.
42. Singh P, Kohr D, Kaps M, Blaes F (2009) Influence of statins on MHC class I expression. *Ann N Y Acad Sci* 1173: 746-751.
43. Belliard G, Coupel S, Charreau B (2005) [Fluvastatin affects HLA class I expression on endothelial cells]. *Nephrol Ther* 1: 221-227.
44. Pich C, Teiti I, Rochaix P, Mariame B, Couderc B, et al. (2013) Statins Reduce Melanoma Development and Metastasis through MICA Overexpression. *Front Immunol* 4: 62.

45. Russell RG, Watts NB, Ebetino FH, Rogers MJ (2008) Mechanisms of action of bisphosphonates: similarities and differences and their potential influence on clinical efficacy. *Osteoporos Int* 19: 733-759.
46. Peng L, Qi Y, Wu H, Wei Q (2011) Interaction of glycyrol with calcineurin A studied by spectroscopic methods and docking. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life* 63: 14-20.
47. Cen J, Wang M, Jiang G, Yin Y, Su Z, et al. (2015) The new immunosuppressant, isogarcinol, binds directly to its target enzyme calcineurin, unlike cyclosporin A and tacrolimus. *Biochimie* 111: 119-124.

Supporting Information

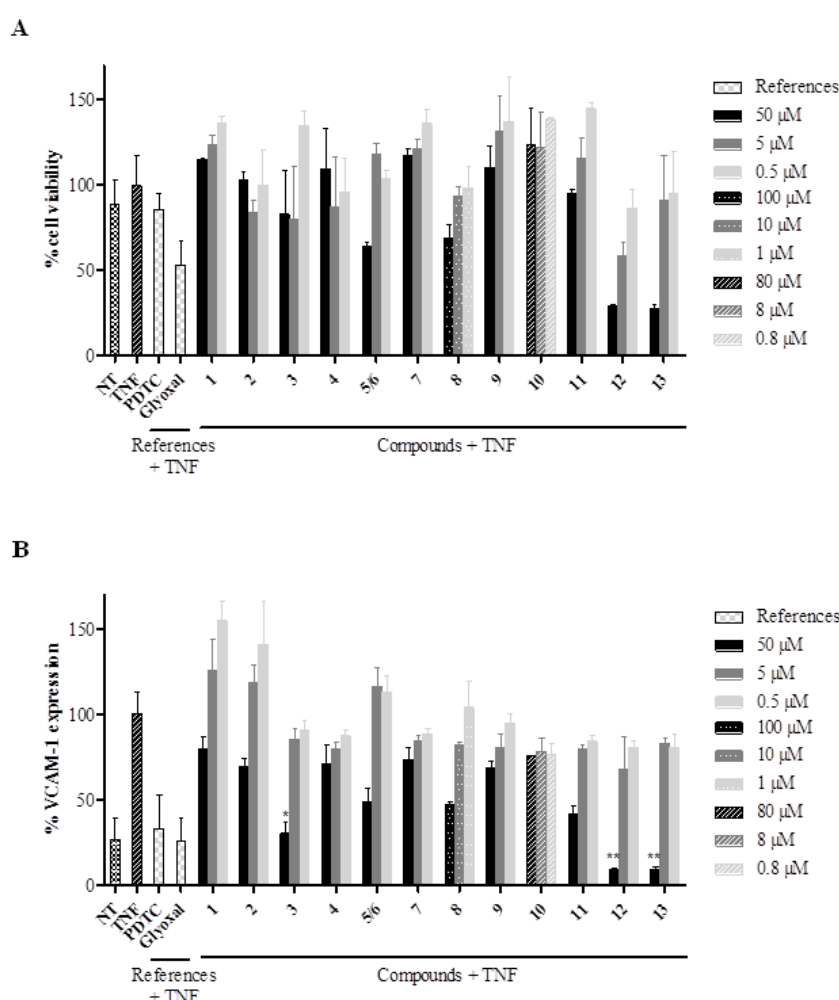


Fig S1. Effects of the polyphenolic compounds on EC viability and VCAM-1 expression. (A) Cellular toxicity on HUVECs was evaluated by a MTT assay using glyoxal (4 mM) as inducer of cell death control. (B) VCAM-1 surface expression was assessed by a cellular ELISA assay after activation of the cells by TNF (200 U/mL, 6h) and using pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC, 200 μ M) as inhibitory reference. A statistic analysis was conducted using Kruskal-Wallis test with Dunn's post-test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ versus TNF).

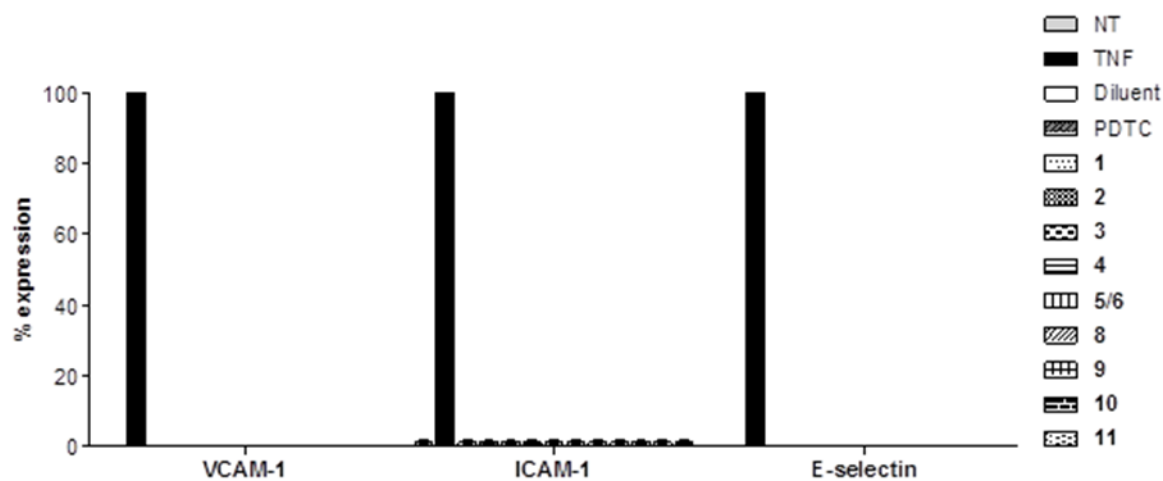


Fig S2. Effect of compounds 1-6 and 8-11 (10 μ M) on the basal expression of inflammatory molecules in HUVECs. PDTC was used at 200 μ M as the inhibition control.

DISCUSSION & CONCLUSION

Nos travaux issus de l'étude des biopsies de greffons cardiaques et des modèles cellulaires montrent la régulation de la voie de signalisation Notch dans les cellules endothéliales et les macrophages intravasculaires au cours du rejet humoral aigu (Paboïs., Pagie *et al.*, 2016). Ces travaux apportent de nouvelles données sur le phénotype et les fonctions des cellules endothéliales vasculaires au cours de l'inflammation et sur le rôle du ligand DLL4 et sur les mécanismes contrôlant la différenciation et la polarisation des macrophages.

Inflammation, activation endothéliale et signalisation Notch

Les travaux antérieurs réalisés au sein de l'équipe (équipe 5/ INSERM UMR1064) ont mis en évidence la modulation de la voie Notch dans les cellules endothéliales par différents stimuli inflammatoires incluant les cytokines TNF et IFN- γ et le LPS (Quillard *et al.*, 2010) appliqués *in vitro* mais aussi *in vivo* dans l'artériosclérose du greffon cardiaque au cours du rejet chronique (Quillard *et al.*, 2008). Ces travaux montrent que l'activation des cellules endothéliales induites par le TNF ou les anticorps alloréactifs altère le profil des récepteurs Notch exprimé par l'endothélium en diminuant notamment l'expression de Notch4, le récepteur Notch exprimé de façon sélective par l'endothélium. En parallèle, le TNF induit aussi une augmentation de l'expression du récepteur Notch2. Dans les conditions testées, l'expression de Notch1 et Notch3 semblent inchangée. Associée à ce « switch » Notch4/Notch2, une diminution globale de l'activité Notch et de la molécule effectrice Hes1 avait été observée indiquant à la fois une activation basale de Notch dans les tapis de cellules endothéliales quiescents et confluent et suggérant que l'activation endothéliale se traduit par une activité Notch décroissante (Quillard *et al.*, 2010, 2008). Ces premières études avaient peu analysé l'expression des ligands Notch. Au cours de ma thèse, nous avons pu confirmer la perte de l'expression de Notch4 par l'endothélium activé à la fois *in vitro* mais également *in vivo* au cours de l'inflammation intravasculaire qui est caractéristique du rejet aigu humoral en transplantation cardiaque humaine (Berry *et al.*, 2013). En effet, nos analyses de RT-PCR quantitative montrent que les transcrits de Notch4 sont significativement diminués dans les biopsies avec un RAH en accord avec nos études précédentes (Quillard *et al.*, 2008). La visualisation de la diminution de Notch4 dans les CE

du greffon, *in situ*, est rendu difficile par les lésions endothéliales et la turgescence des CE observées, au niveau histologique, dans les biopsies avec un RAH et ne permet pas de comparer de façon quantitative avec des vaisseaux de tissus sains. Autre point important, nous avons pu mettre en évidence l'acquisition du ligand Dll4 par l'endothélium activé. Cette observation est un argument supplémentaire liant la signalisation du TNF et la voie Notch rapporté dans nos études précédentes et par d'autres groupes (Sainson *et al.*, 2008). Au total, il semble donc que le TNF diminue Notch4 au profit de Notch2, réduit globalement l'activité de la voie Notch et de l'effecteur *hes1* et augmente fortement l'expression du ligand Dll4. On peut ainsi considérer que l'expression du ligand Dll4 participe au phénotype inflammatoire de l'endothélium comme cela a été montré pour les macrophages proinflammatoires (Fung *et al.*, 2007) et les cellules dendritiques (Laky *et al.*, 2015 ; Sun *et al.*, 2008 ; Thauland et Butte, 2015). En conséquence, Dll4 pourrait donc être utilisé comme marqueur de l'activation endothéliale au même titre que VCAM-1, utilisé dans notre étude.

D'un point de vue mécanistique, nous montrons que la surexpression de Dll4 dans les CE au moyen d'un vecteur viral diminue l'expression de Notch4 suggérant un possible mécanisme de *cis-inhibition* comme proposé dans différentes études (Palmer *et al.*, 2014).

D'un point de vue fonctionnel, la forte acquisition d'un ligand Notch au détriment de récepteur Notch4 pourrait aussi refléter de nouvelles fonctions pour l'endothélium activé avec un rôle de **cellules messagères du signal Notch** plus que de cellules réceptrices. La contribution de Dll4 à des mécanismes de différenciations cellulaires est déjà bien établie, mais, la participation des CE à la différenciation dépendante de Dll4 est un résultat nouveau. Compte tenu du rôle important de Dll4 dans la différenciation des lymphocytes T CD4 et à la balance Th17/Th2 (Radtke *et al.*, 2013), l'expression de Dll4 est un élément supplémentaire suggérant la participation de l'endothélium à l'activation lymphocytaire, et au-delà, à la réponse immune adaptative. A ce titre, des travaux récents suggèrent que **l'axe Dll4/Notch est un signal de co-stimulation** participant au priming des lymphocytes T CD4+ naïfs (Laky *et al.*, 2015). Dll4, exprimé à un niveau physiologique par des CPA (cellules présentatrices d'antigènes), augmente la réponse induite par le complexe HLA-II/peptide et potentialise l'activation de la voie Pi3K résultant de la ligation du TCR et de CD28. L'expression de ligands de CD28 (CD80 ou CD86) est un facteur discriminant une CPA professionnelle d'une cellule

non-professionnelle, exprimant le HLA-II mais sans expression de CD80 ou CD86. Les CE appartiennent à cette catégorie de CPA "non professionnelles" (Choi *et al.*, 2004). L'acquisition de Dll4 au cours de l'activation pourrait peut-être permettre aux CE de fournir une co-stimulation indépendante de CD28 et impliquant d'autres molécules de co-stimulation spécifiques à l'endothélium.

Nous avons également montré au sein de l'équipe que l'inactivation de Notch4 et de Hes1 au moyen de siRNAs dans des cultures primaires de CE provoque l'apoptose (Quillard *et al.*, 2008). De plus, l'activation de N2-ICD favorise l'apoptose des CE en inhibant la survivine, une molécule anti-apoptotique (Quillard *et al.*, 2009). Il semble donc que la modulation de la voie Notch par le TNF, caractérisée par une diminution de Notch4 et une augmentation de Notch2, soit un événement important qui contribue à l'apoptose associée aux dysfonctions de l'endothélium (Quillard *et al.*, 2010). Il reste à déterminer si l'augmentation de Dll4 par l'endothélium activé participe de façon directe ou indirecte à l'apoptose des CE.

Rôle de Dll4 dans le contrôle de la différenciation et de l'apoptose des macrophages.

Les conséquences de la surexpression endothéliale de Dll4 présentée dans cette thèse proposent un rôle important dans l'orientation des macrophages vers un phénotype pro-inflammatoire (M1) ou immunosuppresseur (M2) qui reste à valider dans des modèles gain/perte de fonction cellulaires et animaux pour affiner notamment le rôle spécifique de Dll4, du récepteur Notch et de l'activation canonique de la voie Notch (par l'inactivation de CBF-1 par exemple). L'implication de Dll4 dans une balance entre un phénotype inflammatoire et un phénotype anti-inflammatoire avait déjà été suggérée par plusieurs études montrant la régulation de Dll4 dans les macrophages traités par du LPS ou des cytokines proinflammatoires et la présence de macrophages exprimant Dll4 dans les plaques d'athérome (Fukuda et Aikawa, 2013 ; Wang *et al.*, 2010 ; Fung *et al.*, 2007).

Les observations faites dans les greffons cardiaques au cours du RAH permettent de relier 2 effecteurs du rejet, les CE du greffon et les macrophages, et la voie Notch (**article 1**).

Le rôle de la voie Notch est de plus en plus étudié en transplantation et pourrait, à terme, fournir de nouveaux outils diagnostiques pour le suivi des greffons mais aussi de nouvelles approches thérapeutiques pour induire la tolérance immune. Ainsi, Chen et al., dans un modèle d'allogreffe de foie chez le rat, ont montré une augmentation de Notch1 dans les sérums de rats. Ils concluent que Notch1 est impliqué dans les mécanismes du rejet de l'allogreffe et que la présence du récepteur dans les sérums pourrait constituer un marqueur du rejet aigu en transplantation (Chen *et al.*, 2015). Le groupe d'Ivan Maillard a montré que l'inhibition des ligands agonistes Dll confère une protection contre le rejet de greffe dans un modèle de transplantation allogénique cardiaque chez la souris mais protège également de la GVHD après une transplantation de moelle osseuse ou de cellules hématopoïétiques (Chung *et al.*, 2016 ; Wood *et al.*, 2015 ; Ebens et Maillard, 2013). De même, plusieurs études récentes ont mis en évidence, dans des modèles murins de greffe de moelle osseuse, les effets régulateurs majeurs de la voie de signalisation Notch dans les LT alloréactifs (Sandy *et al.*, 2013 ; Tran *et al.*, 2013). De plus, l'inhibition totale de la signalisation Notch dans les LT alloréactifs induit une protection contre la GVHD aiguë (Tran et al., 2013; Y. Zhang et al., 2011). Dans ces modèles, les récepteurs Notch1/2 et les ligands Dll1/4 sont responsables de l'activation de la voie Notch avec un rôle prédominant pour le récepteur Notch1 et le ligand Dll4. L'inhibition totale de la voie Notch entraîne également une diminution de la production de cytokines pro-inflammatoires en parallèle d'une expansion des LT régulateurs. De même les LT alloréactifs privés de signalisation Notch montre une diminution de leur capacité de réponse suggérant un rôle de cette voie dans le mécanisme de tolérance (Sandy et al., 2013; Y. Zhang et al., 2011).

Les macrophages et leurs précurseurs, les monocytes, sont des constituant essentiels de la réponse immunitaire innée et représentent la première ligne de défense contre les pathogènes. Dans le contexte de la transplantation, les macrophages peuvent être impliqués dans les lésions vasculaires et tissulaires du greffon mais également aux processus de réparation tissulaire ou encore jouer un rôle soit immunorégulateur soit immunosuppresseur selon leur état d'activation (Martinez et Gordon, 2014 ; Sica et Mantovani, 2012 ; Gordon et Martinez, 2010). L'accumulation des macrophages dans le greffon allogénique est associée

au rejet aigu humoral mais également au rejet cellulaire (Fishbein et Kobashigawa, 2004 ; Tinckam *et al.*, 2005). Dans les cas du rejet aigu et chronique, dans des modèles animaux aussi bien que chez l'homme les macrophages représentent 40 à 60% des cellules ayant infiltré le greffon au moment du rejet (Hancock *et al.*, 1983 ; Schmidt *et al.*, 2007). La déplétion de ces cellules conduit à une diminution des dommages induits au greffon et à une réduction des critères histologiques du rejet (Jose *et al.*, 2003 ; Qi *et al.*, 2008). De même, l'inhibition de l'accumulation et de l'activation des macrophages dans des modèles d'allogreffe cardiaque murins empêche les dommages induits au greffon et empêche le rejet (Abe *et al.*, 2014 ; Takeiri *et al.*, 2011). Différents modèles de transplantations associés à une déplétion des cellules lymphocytaires T proposent un rôle majeur et délétère des macrophages. En effet dans ces modèles, la présence uniquement des macrophages suffit à induire des lésions du greffon (Kirk *et al.*, 2005 ; Valenzuela *et al.*, 2013). Ces résultats révèlent les macrophages comme des cellules essentielles dans l'induction du rejet aigu humoral. Cependant, les mécanismes exacts par lesquels les macrophages induisent des dommages microvasculaires ne sont pas complètement compris. Des études menées *in vitro* et *in vivo* ont montré que la production de médiateurs inflammatoires est un mécanisme central par lequel les macrophages favorisent le rejet (Mosser et Edwards, 2008). Les macrophages impliqués sont donc de types pro-inflammatoires M1. Au sein du greffon, les macrophages produisent de nombreux médiateurs solubles pro-inflammatoires tels que l'IL-2, l'IL-6, l'IL-12, le MCP-1 et le TNF qui vont induire l'activation endothéliale, et conduire à la perte de l'intégrité vasculaire ainsi qu'au recrutement des leucocytes (Salehi et Reed, 2015).

Notch, Dll4 et signalisation intracellulaire : interférence avec la signalisation de l'IL-4/IL-4R.

Les travaux *in silico* de Guruharsha ont permis de répertorié toutes les intrications et interactions de la voie Notch avec d'autres voies de signalisations intracellulaires. Ce travail met en évidence la complexité de la voie de signalisation Notch et le nombre de fonctions dans lesquelles elle peut être impliquée (Guruharsha *et al.*, 2012).

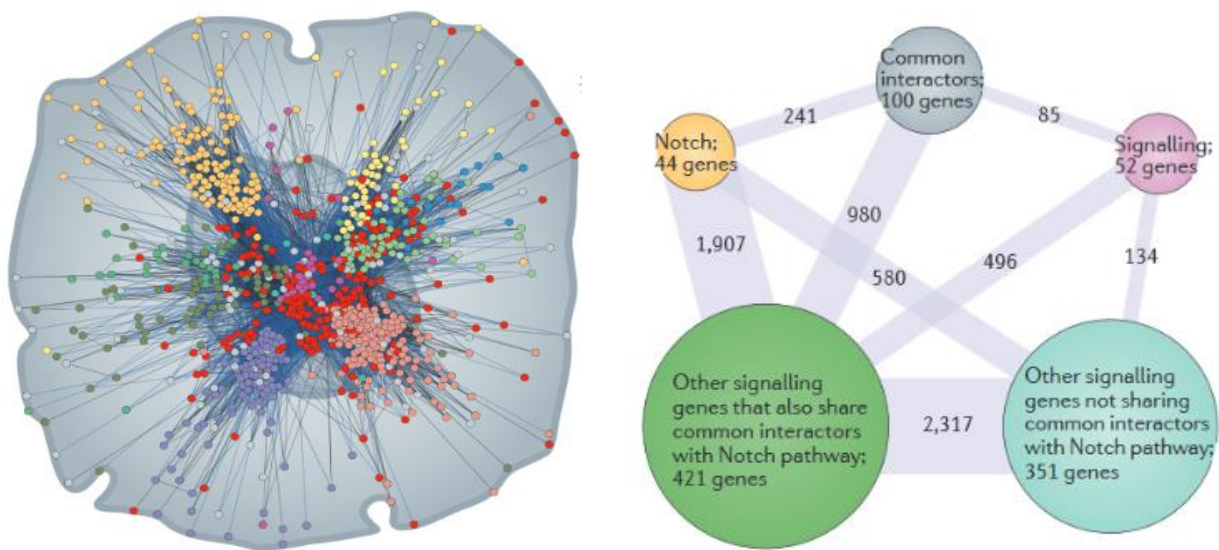


Figure 34 : Interactions intracellulaires de la voie de signalisation Notch. (A) Visualisation des interactions des réseaux de signalisations intracellulaires et de la voie de signalisation Notch. Les cercles rouges représentent les voies de signalisations dont un/des membre(s) sont partagés avec la voie de signalisation Notch. (B) Représentation schématique des interactions de la voie Notch avec d'autres voies de signalisations. Le nombre de gènes impliqués sont signalés dans les cercles de chaque catégorie. Les chiffres visibles sur les lignes bleues représentent les interactions génétiques et physiques entre chaque catégorie (d'après Guruharsha *et al.*, 2012).

D'après cette étude, la voie Notch peut engager 2728 interactions directes, génétiques ou physiques, avec d'autres voies de signalisations, et au total 6740 interactions directes ou indirectes. C'est pourquoi selon le récepteur mobilisé ou le ligand impliqué, la voie de signalisation Notch peut être susceptible d'induire des effets opposés. Il est nécessaire au cours des travaux sur cette voie de signalisation d'aborder les récepteurs et ligands impliqués sous peine de transmettre un message pouvant être contradictoire.

Différentes études montrent l'interaction de la voie Notch *via* Dll4 et de la voie NFκB notamment au cours de l'activation par des stimuli inflammatoires conduisant au phénotype M1 (Fung *et al.*, 2007 ; Wang *et al.*, 2010 ; Xu *et al.*, 2012). Des interactions entre Notch/Dll4 et la voie Pi3K ont aussi été démontrées en particulier dans les cellules endothéliales et des modèles d'angiogénèse en réponse au VEGF (Zhang *et al.*, 2011). Dans nos travaux (**article 2**), l'activation de la voie Notch, médiée par Dll4 et Notch 1 dans le macrophage inhibe la polarisation en macrophage M2. Un rôle similaire de Dll4 dans l'inhibition de la différenciation cellulaire des mégakaryocytes a déjà été rapporté (Poirault-Chassac *et al.*, 2010). De plus, nous montrons que l'inhibition de la polarisation en macrophage M2 est associée à une apoptose induite spécifiquement dans le macrophage à la signalisation induite par l'IL-4. Nos résultats suggèrent donc une interaction entre les voies de signalisation Notch et IL-4/IL-4R conduisant à l'inhibition de la transcription de gènes spécifiques des macrophages M2 régulés par l'IL-4 tels que CD11b, CD200, CD206 et à la mort des cellules par apoptose. La voie de signalisation de l'IL-4/IL-4R est bien connue et est schématisée ci-dessous (Figure 35)(Jiang *et al.*, 2000). Les points d'interaction avec la voie Notch sont potentiellement multiples. L'activation de la kinase JAK1 et de STAT6 étant des événements précoces, nous avons, dans un premier temps, testés la possibilité que la voie Notch intervienne en bloquant cette étape. Le blocage de JAK/STAT au moyen du Ruxolitinib réalisé en présence d'IL-4 et de Dll4 nous a montré que dans ces conditions on obtient une forte inhibition des marqueurs CD11b, CD200R et CD206 mais aussi la potentialisation de l'effet pro-apoptotique de Dll4 (**article 2, figure 5**). STAT6 est un facteur de transcription impliqué dans la régulation des gènes M2 (Brunn *et al.*, 2014).

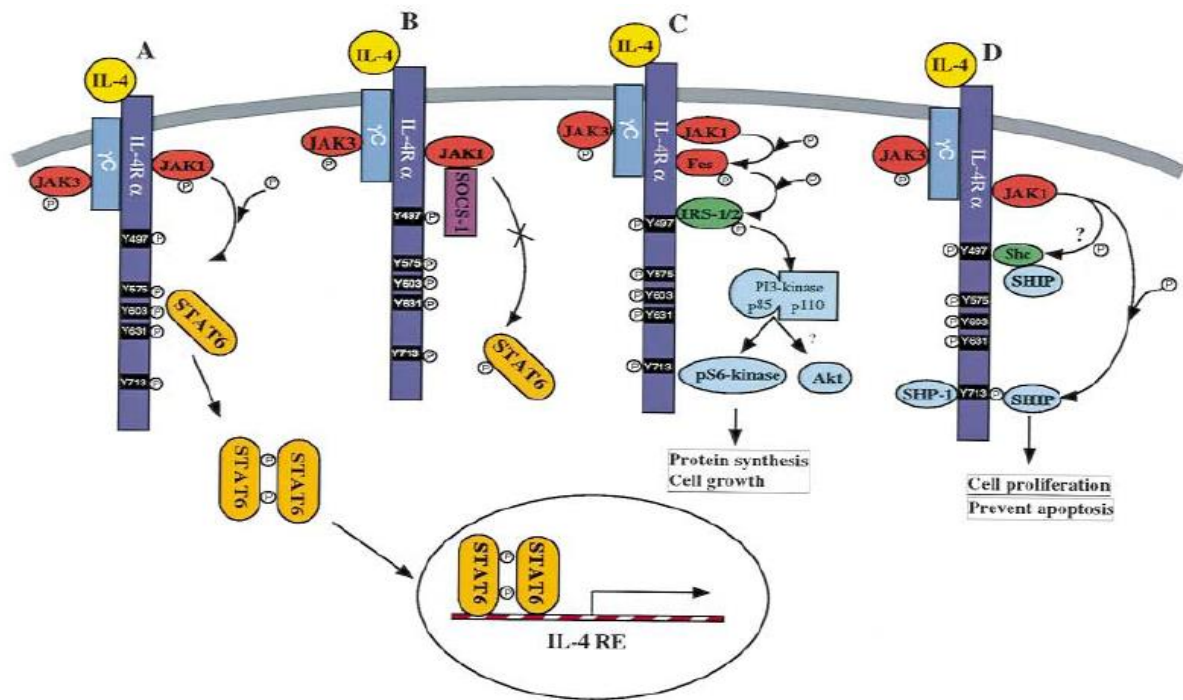


Figure 35 : Voies de signalisations activées par l'IL-4. (A) L'IL-4 induit la phosphorylation de JAK1/3, qui à son tour phosphoryle l'IL-4R α et STAT6. STAT6 phosphorylée va former un dimère qui pourra alors entrer dans le noyau et se fixer à des séquences ADN spécifiques de gènes cibles de la voie de l'IL-4. (B) SOCS1 joue un rôle inhibiteur de la synthèse des gènes répondant à l'IL-4 par l'inhibition de la phosphorylation JAK1/STAT6 induite par la signalisation IL-4. (C) L'IL-4 induit la phosphorylation d'IRS1/2 qui va permettre l'activation de la voie de signalisation PI3K en interagissant avec la sous-unité p85. L'activation de la voie de signalisation PI3K entraîne la promotion et la transcription des processus de synthèse protéique et de prolifération cellulaire. (D) L'IL-4 induit le recrutement et la phosphorylation de SHIP intervenant dans les mécanismes de prolifération et de survie cellulaire (d'après Jiang *et al.*, 2000).

Des expériences supplémentaires seront nécessaires pour obtenir une preuve directe de l'effet inhibiteur de Dll4 sur JAK/STAT notamment en réalisant des Western blot pour analyser l'effet de Dll4 sur la phosphorylation de JAK1 et de STAT6. L'étude de la voie de l'IL-4 fait aussi apparaître d'autres molécules candidates dans la cascade d'activation telles que SOCS1, un inhibiteur de JAK1 dont l'expression pourrait être augmentée par la signalisation Notch mais encore Akt et Bcl-6 qui pourrait être aussi dérégulés par Notch et participer à l'apoptose. D'un autre côté, une revue récente établit STAT6, IRF4 et PPAR γ (peroxysomes proliferator-activated receptor- γ) comme les facteurs de transcription les plus spécifiques de la polarisation des macrophages M2 (Figure 36) et un effet direct ou indirect de Dll4 sur IRF4 et PPAR γ n'est pas à exclure (Lawrence et Natoli, 2011).

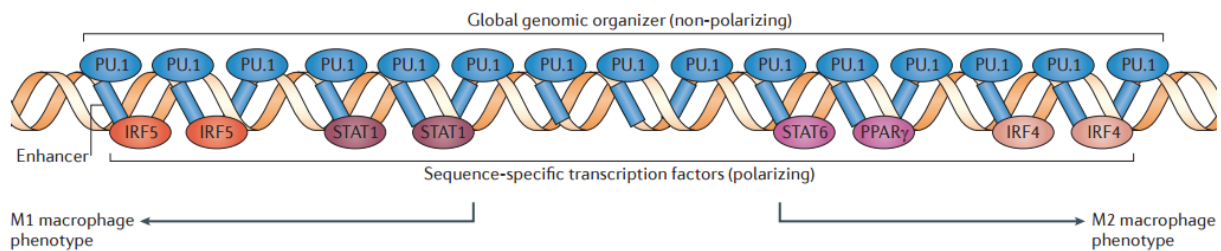


Figure 36. Contrôle transcriptionnel de l'identité et de la polarisation des macrophages. Le schéma décrit les différents rôles des facteurs de transcription qui déterminent la polarisation des macrophages par rapport aux facteurs de transcription « non-polarisants » (qui déterminent l'identité macrophage par la réglementation du paysage génomique global). Le macrophage phénotype M1 est contrôlé par les facteurs STAT1 et IRF5, alors que STAT6, IRF4 et PPAR γ (peroxysomes proliferator-activated receptor- γ) régulent la polarisation des macrophages M2. Ces facteurs agissent sur des sous-populations distinctes du répertoire. En revanche, le facteur de transcription PU.1 contrôle le répertoire global spécifique des macrophages, indépendamment de la polarisation (D'après Lawrence et Natoli, 2011).

Différentes études ont fait le lien entre la signalisation Notch et l'apoptose. Ainsi, il a été montré que l'inhibition de la voie Notch par un inhibiteur des γ -secretase associé à la signalisation induite par le LPS entraîne l'apoptose du macrophage M1 par un défaut de phosphorylation de la protéine Akt, composant de la voie de signalisation Pi3K, voie majeure de la survie cellulaire (Sangphech *et al.*, 2014 ; Wongchana et Palaga, 2012). Plusieurs études récentes, menées dans les cellules endothéliales ou dans une lignée de cellules cancéreuses pulmonaire sont en accord avec ces résultats, dans lesquels l'inhibition de la voie Notch induit une apoptose (Dabral *et al.*, 2016 ; Zheng *et al.*, 2016). Dans leur étude, Zheng *et al.*, mettent également en avant l'induction de l'apoptose par l'inhibition de la voie JAK/STAT3. Cependant au cours de notre étude nous montrons un résultat contradictoire puisque c'est l'activation de la voie de signalisation Notch qui induit l'apoptose des macrophages M2. De plus nous montrons une apoptose induite plus importante dans les macrophages M2 en association avec l'activation de la voie JAK/STAT induite par l'IL-4 lors de la polarisation M2. En accord avec nos résultats, récemment, Zeng *et al.*, ont associé CSL, médiateur pouvant être recruté par NICD dans le noyau au moment de la transcription, à l'induction de l'apoptose par l'axe Hes1-PTEN-Akt-mTOR. Ils montrent également la possibilité d'une apoptose induite de manière CSL indépendante *via* la signalisation NIC-mTORC2-Akt-mTOR (Zeng *et al.*, 2016). Cependant en accord avec Zheng nous mettons en évidence que l'activation de la voie de signalisation Notch associé à l'inhibition de la voie JAK/STAT entraîne également une apoptose très importante chez le macrophage M2.

Dans notre étude nous avons mis en évidence l'activation des caspases 3/7 dans les macrophages différenciés en présence d'IL-4 et de Dll4. Le pourcentage de cellules mortes peut atteindre plus de 90% à 48h de traitement et montre un effet puissant de Dll4. Des expériences sont en cours pour mieux caractériser les mécanismes effecteurs de cette apoptose au moyen d'une puce à RT-PCR pour l'analyse de 94 molécules impliquées dans l'apoptose. Dans l'attente de ces résultats on peut aussi spéculer sur l'importance physiologique de l'effet apoptotique de Dll4. Tout d'abord sur la nature des cellules capable d'induire ce phénomène, nous savons que l'expression de Dll4 est restreinte aux cellules endothéliales et aux cellules myéloïdes incluant macrophages et cellules dendritiques (Radtke *et al.*, 2013). Plus précisément, l'expression de Dll4 semble particulièrement élevée sur les CE activées et les macrophages M1 (Fung *et al.*, 2007 ; Fukuda et Aikawa, 2013; Pabois *et al.*, 2016).

Nous pouvons donc supposer qu'au-delà de leur rôle régulateur dans la différenciation lymphocytaire, ces cellules (CE et M1) pourraient aussi directement influencer la polarisation des macrophages en M2 et exercer une de sélection négative comme il peut l'être retrouvé au sein du thymus. Cette hypothèse reste bien sûr à démontrer. De plus, l'effet régulateur de Dll4 n'a pas été observé pour Dll1 ce qui renforce aussi l'idée d'une spécificité de ligands déjà montré dans d'autre études (Laky *et al.*, 2015).

Conclusion

La finalité de ce travail de recherche a pour objectif de mieux comprendre, détecter et prévenir le rejet humoral en transplantation. Au cours de cette thèse, l'ensemble des observations et résultats permet de dégager quelques pistes à poursuivre pour une meilleure compréhension des mécanismes du rejet humoral et pour des approches de prévention et de traitement.

- 1) L'identification de Dll4 comme un facteur important de « programmation » phénotypique et fonctionnelle des macrophages renforce l'importance de cette voie de signalisation dans les mécanismes cellulaires liés au rejet de greffe. **Détecter l'expression Dll4** par l'endothélium du greffon et par les macrophages intravasculaires ou périvasculaires par immunomarquage dans des biopsies pourrait donc aider à caractériser l'activation de l'endothélium et la nature de l'infiltrat macrophagique et, au-delà, être indicatif de l'état d'inflammation du greffon.

Nos résultats suggèrent aussi que **bloquer l'expression de Dll4** permettrait d'influer sur le phénotype des macrophages en favorisant un phénotype immunosuppresseur, réparateur de type M2. Il convient de noter que notre étude souligne aussi l'importance de l'IL-6 pour l'acquisition du phénotype M1. Il serait donc intéressant de pouvoir valider ces premiers résultats et ces hypothèses en testant l'effet d'un **blocage de Dll4 et de l'IL6R** au moyen d'anticorps bloquants déjà disponibles dans des modèles de transplantation d'organes chez l'animal.

- 2) Notre étude de la réactivité humorale dans un groupe de transplantés rénaux ayant présenté un épisode de rejet aigu humoral en l'absence d'anticorps anti-HLA a permis d'identifier les CE microvasculaires (glomérulaires rénales) comme cibles majeures et quasi-exclusives de ces anticorps. Nos résultats montrent que ces anticorps sont présents au moment de la greffe et l'identification des cibles antigéniques est en cours et devrait, à terme, permettre de **rechercher et de détecter la présence de ces anticorps réagissant avec les CE microvasculaires** chez

les receveurs avant la transplantation au moyen d'un test simple de type Elisa pour prévenir le rejet humoral.

- 3) Les résultats de notre étude sur les polyphénols prénylés d'origine végétale identifient plusieurs molécules actives sur l'endothélium, dont des coumarines, capables de réduire de façon très importante l'expression basale ou induite de molécules de l'inflammation telles que VCAM-1 mais aussi et surtout d'un set de molécule du CMH de classe I et II. **Les polyphénols prénylés d'origine végétale identifiés dans notre étude sont donc des molécules d'intérêt pour moduler (de façon transitoire ?) l'expression de molécule du CMH de classe I et II, cibles des anticorps allogéniques lors du rejet humoral.** Il faudrait aussi poursuivre cette caractérisation pour définir le spectre d'action de ces molécules sur l'immunité et la signalisation. Poursuivre le « bioguidage » sur les CE et les études structures/fonctions devrait aider à produire de nouvelles molécules plus efficaces.

Bibliographie

- Abe, T., Su, C.A., Iida, S., Baldwin, W.M., Nonomura, N., Takahara, S., Fairchild, R.L., 2014. Graft-derived CCL2 increases graft injury during antibody-mediated rejection of cardiac allografts. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* 14, 1753–1764. doi:10.1111/ajt.12780
- Ali, M., Arfan, M., Ahmad, M., Singh, K., Anis, I., Ahmad, H., Choudhary, M.I., Shah, M.R., 2011. Anti-inflammatory xanthenes from the twigs of *Hypericum oblongifolium* wall. *Planta Med.* 77, 2013–2018. doi:10.1055/s-0031-1280114
- Amico, P., Hönger, G., Biemann, D., Lutz, D., Garzoni, D., Steiger, J., Mihatsch, M.J., Dragun, D., Schaub, S., 2008. Incidence and prediction of early antibody-mediated rejection due to non-human leukocyte antigen-antibodies. *Transplantation* 85, 1557–1563. doi:10.1097/TP.0b013e31816f612a
- Amsen, D., Antov, A., Flavell, R.A., 2009. The different faces of Notch in T-helper-cell differentiation. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 116–124. doi:10.1038/nri2488
- Amsen, D., Helbig, C., Backer, R.A., 2015. Notch in T Cell Differentiation: All Things Considered. *Trends Immunol.* 36, 802–814. doi:10.1016/j.it.2015.10.007
- Andersen, P., Uosaki, H., Shenje, L.T., Kwon, C., 2012. Non-canonical Notch signaling: emerging role and mechanism. *Trends Cell Biol.* 22, 257–265. doi:10.1016/j.tcb.2012.02.003
- Andersson, E.R., Lendahl, U., 2014. Therapeutic modulation of Notch signalling--are we there yet? *Nat. Rev. Drug Discov.* 13, 357–378. doi:10.1038/nrd4252
- Andrews, M.B., Xu, X., Liu, H., Ficarro, S.B., Marto, J.A., Aster, J.C., Blacklow, S.C., 2013. Intrinsic selectivity of Notch 1 for Delta-like 4 over Delta-like 1. *J. Biol. Chem.* 288, 25477–25489. doi:10.1074/jbc.M113.454850
- Arnold, C.E., Whyte, C.S., Gordon, P., Barker, R.N., Rees, A.J., Wilson, H.M., 2014. A critical role for suppressor of cytokine signalling 3 in promoting M1 macrophage activation and function in vitro and in vivo. *Immunology* 141, 96–110. doi:10.1111/imm.12173
- Ashkenazi, A., Dixit, V.M., 1998. Death receptors: signaling and modulation. *Science* 281, 1305–1308.
- Bassil, R., Orent, W., Elyaman, W., 2013. Notch signaling and T-helper cells in EAE/MS. *Clin. Dev. Immunol.* 2013, 570731. doi:10.1155/2013/570731
- Bernsmeier, C., Dill, M.T., Provenzano, A., Makowska, Z., Krol, I., Muscogiuri, G., Semela, D., Tornillo, L., Marra, F., Heim, M.H., Duong, F.H.T., 2016. Hepatic Notch1 deletion predisposes to diabetes and steatosis via glucose-6-phosphatase and perilipin-5 upregulation. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* doi:10.1038/labinvest.2016.75
- Berry, G.J., Burke, M.M., Andersen, C., Bruneval, P., Fedrigo, M., Fishbein, M.C., Goddard, M., Hammond, E.H., Leone, O., Marboe, C., Miller, D., Neil, D., Rassl, D., Revelo, M.P., Rice, A., Rene Rodriguez, E., Stewart, S., Tan, C.D., Winters, G.L., West, L., Mehra, M.R., Angelini, A., 2013. The 2013 International Society for Heart and Lung Transplantation Working Formulation for the standardization of nomenclature in the pathologic diagnosis of antibody-mediated rejection in heart transplantation. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* 32, 1147–1162. doi:10.1016/j.healun.2013.08.011

- Bettenhausen, B., Hrabě de Angelis, M., Simon, D., Guénet, J.L., Gossler, A., 1995. Transient and restricted expression during mouse embryogenesis of Dll1, a murine gene closely related to *Drosophila* Delta. *Dev. Camb. Engl.* 121, 2407–2418.
- Birch, K.A., Ewenstein, B.M., Golan, D.E., Pober, J.S., 1994. Prolonged peak elevations in cytoplasmic free calcium ions, derived from intracellular stores, correlate with the extent of thrombin-stimulated exocytosis in single human umbilical vein endothelial cells. *J. Cell. Physiol.* 160, 545–554. doi:10.1002/jcp.1041600318
- Bonfanti, R., Furie, B.C., Furie, B., Wagner, D.D., 1989. PADGEM (GMP140) is a component of Weibel-Palade bodies of human endothelial cells. *Blood* 73, 1109–1112.
- Brunn, A., Mihelcic, M., Carstov, M., Hummel, L., Geier, F., Schmidt, A., Saupe, L., Utermöhlen, O., Deckert, M., 2014. IL-10, IL-4, and STAT6 promote an M2 milieu required for termination of P0(106-125)-induced murine experimental autoimmune neuritis. *Am. J. Pathol.* 184, 2627–2640. doi:10.1016/j.ajpath.2014.06.012
- Brzozowa, M., Wojnicz, R., Kowalczyk-Ziomek, G., Helewski, K., 2013. The Notch ligand Delta-like 4 (DLL4) as a target in angiogenesis-based cancer therapy? *Contemp. Oncol.* 17, 234–237. doi:10.5114/wo.2013.35588
- Burlingham, W.J., Love, R.B., Jankowska-Gan, E., Haynes, L.D., Xu, Q., Bobadilla, J.L., Meyer, K.C., Hayney, M.S., Braun, R.K., Greenspan, D.S., Gopalakrishnan, B., Cai, J., Brand, D.D., Yoshida, S., Cummings, O.W., Wilkes, D.S., 2007. IL-17-dependent cellular immunity to collagen type V predisposes to obliterative bronchiolitis in human lung transplants. *J. Clin. Invest.* 117, 3498–3506. doi:10.1172/JCI28031
- Calderón, L., Boehm, T., 2012. Synergistic, context-dependent, and hierarchical functions of epithelial components in thymic microenvironments. *Cell* 149, 159–172. doi:10.1016/j.cell.2012.01.049
- Canet, E., Devallière, J., Gérard, N., Karam, G., Giral, M., Charreau, B., Coupel, S., 2012. Profiling posttransplant circulating antibodies in kidney transplantation using donor endothelial cells. *Transplantation* 93, 257–264. doi:10.1097/TP.0b013e31823ec0ec
- Cardone, M.H., Roy, N., Stennicke, H.R., Salvesen, G.S., Franke, T.F., Stanbridge, E., Frisch, S., Reed, J.C., 1998. Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science* 282, 1318–1321.
- Carter, V., Shenton, B.K., Jaques, B., Turner, D., Talbot, D., Gupta, A., Chapman, C.E., Matthews, C.J., Cavanagh, G., 2005. Vimentin antibodies: a non-HLA antibody as a potential risk factor in renal transplantation. *Transplant. Proc.* 37, 654–657. doi:10.1016/j.transproceed.2004.12.043
- Catelain, C., Michelet, F., Hattabi, A., Poirault-Chassac, S., Kortulewski, T., Tronik-Le Roux, D., Vainchenker, W., Lauret, E., 2014. The Notch Delta-4 ligand helps to maintain the quiescence and the short-term reconstitutive potential of haematopoietic progenitor cells through activation of a key gene network. *Stem Cell Res.* 13, 431–441. doi:10.1016/j.scr.2014.10.002
- Chao, J.-T., Gapor, A., Theriault, A., 2002. Inhibitory effect of delta-tocotrienol, a HMG CoA reductase inhibitor, on monocyte-endothelial cell adhesion. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)* 48, 332–337.

- Chauveau, A., Tonnerre, P., Pabois, A., Gavlovsky, P.-J., Chatelais, M., Coupel, S., Charreau, B., 2014. Endothelial cell activation and proliferation modulate NKG2D activity by regulating MICA expression and shedding. *J. Innate Immun.* 6, 89–104. doi:10.1159/000351605
- Chen, L., He, W., Huang, K., Zheng, L., Gao, L., Liu, J., Huang, A., 2015. Increased expression of Notch 1 in a rat liver transplantation model. *Mol. Med. Rep.* 12, 5293–5297. doi:10.3892/mmr.2015.4026
- Chih, S., Chruscinski, A., Ross, H.J., Tinckam, K., Butany, J., Rao, V., 2012. Antibody-Mediated Rejection: An Evolving Entity in Heart Transplantation. *J. Transplant.* 2012. doi:10.1155/2012/210210
- Chitnis, A., 2006. Why is delta endocytosis required for effective activation of notch? *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 235, 886–894. doi:10.1002/dvdy.20683
- Choi, J., Enis, D.R., Koh, K.P., Shiao, S.L., Pober, J.S., 2004. T lymphocyte-endothelial cell interactions. *Annu. Rev. Immunol.* 22, 683–709. doi:10.1146/annurev.immunol.22.012703.104639
- Chung, J., Riella, L.V., Maillard, I., 2016. Targeting the Notch pathway to prevent rejection. *Am. J. Transplant.* n/a–n/a. doi:10.1111/ajt.13816
- Cordle, J., Redfieldz, C., Stacey, M., van der Merwe, P.A., Willis, A.C., Champion, B.R., Hambleton, S., Handford, P.A., 2008. Localization of the delta-like-1-binding site in human Notch-1 and its modulation by calcium affinity. *J. Biol. Chem.* 283, 11785–11793. doi:10.1074/jbc.M708424200
- Coupel, S., Moreau, A., Hamidou, M., Horejsi, V., Soulillou, J.-P., Charreau, B., 2007. Expression and release of soluble HLA-E is an immunoregulatory feature of endothelial cell activation. *Blood* 109, 2806–2814. doi:10.1182/blood-2006-06-030213
- Dabral, S., Tian, X., Kojonazarov, B., Savai, R., Ghofrani, H.A., Weissmann, N., Florio, M., Sun, J., Jonigk, D., Maegel, L., Grimminger, F., Seeger, W., Savai Pullamsetti, S., Schermuly, R.T., 2016. Notch1 signalling regulates endothelial proliferation and apoptosis in pulmonary arterial hypertension. *Eur. Respir. J.* doi:10.1183/13993003.00773-2015
- Dang, B.T., Gény, C., Blanchard, P., Rouger, C., Tonnerre, P., Charreau, B., Rakolomalala, G., Randriamboavonjy, J.I., Loirand, G., Pacaud, P., Litaudon, M., Richomme, P., Séraphin, D., Derbré, S., 2014. Advanced glycation inhibition and protection against endothelial dysfunction induced by coumarins and procyanidins from *Mammea neurophylla*. *Fitoterapia* 96, 65–75. doi:10.1016/j.fitote.2014.04.005
- Davis, M.J., Tsang, T.M., Qiu, Y., Dayrit, J.K., Freij, J.B., Huffnagle, G.B., Olszewski, M.A., 2013. Macrophage M1/M2 polarization dynamically adapts to changes in cytokine microenvironments in *Cryptococcus neoformans* infection. *mBio* 4, e00264–00213. doi:10.1128/mBio.00264-13
- De Caterina, R., Libby, P., Peng, H.B., Thannickal, V.J., Rajavashisth, T.B., Gimbrone, M.A., Shin, W.S., Liao, J.K., 1995. Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. *J. Clin. Invest.* 96, 60–68. doi:10.1172/JCI118074

- Delville, M., Charreau, B., Rabant, M., Legendre, C., Anglicheau, D., 2016. Pathogenesis of non-HLA antibodies in solid organ transplantation: Where do we stand? *Hum. Immunol.* doi:10.1016/j.humimm.2016.05.021
- Doseff, A.I., 2004. Apoptosis: the sculptor of development. *Stem Cells Dev.* 13, 473–483. doi:10.1089/scd.2004.13.473
- Dragun, D., Catar, R., Philippe, A., 2013. Non-HLA antibodies in solid organ transplantation: recent concepts and clinical relevance. *Curr. Opin. Organ Transplant.* 18, 430–435. doi:10.1097/MOT.0b013e3283636e55
- Dragun, D., Müller, D.N., Bräsen, J.H., Fritsche, L., Nieminen-Kelhä, M., Dechend, R., Kintscher, U., Rudolph, B., Hoebeke, J., Eckert, D., Mazak, I., Plehm, R., Schönemann, C., Unger, T., Budde, K., Neumayer, H.-H., Luft, F.C., Wallukat, G., 2005. Angiotensin II type 1-receptor activating antibodies in renal-allograft rejection. *N. Engl. J. Med.* 352, 558–569. doi:10.1056/NEJMoa035717
- D'Souza, B., Meloty-Kapella, L., Weinmaster, G., 2010. Canonical and non-canonical Notch ligands. *Curr. Top. Dev. Biol.* 92, 73–129. doi:10.1016/S0070-2153(10)92003-6
- D'Souza, B., Miyamoto, A., Weinmaster, G., 2008. The many facets of Notch ligands. *Oncogene* 27, 5148–5167. doi:10.1038/onc.2008.229
- Dudek, S.M., Garcia, J.G., 2001. Cytoskeletal regulation of pulmonary vascular permeability. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* 1985 91, 1487–1500.
- Dunwoodie, S.L., Henrique, D., Harrison, S.M., Beddington, R.S., 1997. Mouse Dll3: a novel divergent Delta gene which may complement the function of other Delta homologues during early pattern formation in the mouse embryo. *Dev. Camb. Engl.* 124, 3065–3076.
- Ebens, C.L., Maillard, I., 2013. Notch signaling in hematopoietic cell transplantation and T cell alloimmunity. *Blood Rev.* 27, 269–277. doi:10.1016/j.blre.2013.08.001
- Egan, K., FitzGerald, G.A., 2006. Eicosanoids and the vascular endothelium. *Handb. Exp. Pharmacol.* 189–211.
- Egan, S.E., St-Pierre, B., Leow, C.C., 1998. Notch receptors, partners and regulators: from conserved domains to powerful functions. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 228, 273–324.
- Ellisen, L.W., Bird, J., West, D.C., Soreng, A.L., Reynolds, T.C., Smith, S.D., Sklar, J., 1991. TAN-1, the human homolog of the *Drosophila* notch gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms. *Cell* 66, 649–661.
- El Ters, M., Grande, J.P., Keddis, M.T., Rodrigo, E., Chopra, B., Dean, P.G., Stegall, M.D., Cosio, F.G., 2013. Kidney allograft survival after acute rejection, the value of follow-up biopsies. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* 13, 2334–2341. doi:10.1111/ajt.12370
- Eun, S.Y., Seo, J., Park, S.W., Lee, J.H., Chang, K.C., Kim, H.J., 2014. LPS potentiates nucleotide-induced inflammatory gene expression in macrophages via the upregulation of P2Y2 receptor. *Int. Immunopharmacol.* 18, 270–276. doi:10.1016/j.intimp.2013.11.026

- Farkash, E.A., Colvin, R.B., 2012. Diagnostic challenges in chronic antibody-mediated rejection. *Nat. Rev. Nephrol.* 8, 255–257. doi:10.1038/nrneph.2012.61
- Ferchichi, L., Derbré, S., Mahmood, K., Touré, K., Guilet, D., Litaudon, M., Awang, K., Hadi, A.H.A., Le Ray, A.M., Richomme, P., 2012. Bioguided fractionation and isolation of natural inhibitors of advanced glycation end-products (AGEs) from *Calophyllum flavoramulum*. *Phytochemistry* 78, 98–106. doi:10.1016/j.phytochem.2012.02.006
- Ferry, B.L., Welsh, K.I., Dunn, M.J., Law, D., Proctor, J., Chapel, H., Yacoub, M.H., Rose, M.L., 1997. Anti-cell surface endothelial antibodies in sera from cardiac and kidney transplant recipients: association with chronic rejection. *Transpl. Immunol.* 5, 17–24.
- Feucht, H.E., Felber, E., Gokel, M.J., Hillebrand, G., Nattermann, U., Brockmeyer, C., Held, E., Riethmüller, G., Land, W., Albert, E., 1991. Vascular deposition of complement-split products in kidney allografts with cell-mediated rejection. *Clin. Exp. Immunol.* 86, 464–470.
- Feucht, H.E., Schneeberger, H., Hillebrand, G., Burkhardt, K., Weiss, M., Riethmüller, G., Land, W., Albert, E., 1993. Capillary deposition of C4d complement fragment and early renal graft loss. *Kidney Int.* 43, 1333–1338.
- Fishbein, M.C., Kobashigawa, J., 2004. Biopsy-negative cardiac transplant rejection: etiology, diagnosis, and therapy. *Curr. Opin. Cardiol.* 19, 166–169.
- Fouotsa, H., Lannang, A.M., Dzoyem, J.P., Tatsimo, S.J.N., Neumann, B., Mbazona, C.D., Razakarivony, A.A., Nkengfack, A.E., Eloff, J.N., Sewald, N., 2015. Antibacterial and antioxidant xanthenes and benzophenone from *garcinia smeathmannii*. *Planta Med.* 81, 594–599. doi:10.1055/s-0035-1545841
- Frangogiannis, N.G., 2006. Targeting the inflammatory response in healing myocardial infarcts. *Curr. Med. Chem.* 13, 1877–1893.
- Fredrich, R., Toyoda, M., Czer, L.S., Galfayan, K., Galera, O., Trento, A., Freimark, D., Young, S., Jordan, S.C., 1999. The clinical significance of antibodies to human vascular endothelial cells after cardiac transplantation. *Transplantation* 67, 385–391.
- Fukuda, D., Aikawa, E., Swirski, F.K., Novobrantseva, T.I., Kotelianski, V., Gorgun, C.Z., Chudnovskiy, A., Yamazaki, H., Croce, K., Weissleder, R., Aster, J.C., Hotamisligil, G.S., Yagita, H., Aikawa, M., 2012. Notch ligand Delta-like 4 blockade attenuates atherosclerosis and metabolic disorders. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, E1868–E1877. doi:10.1073/pnas.1116889109
- Fukuda, D., Aikawa, M., 2013. The Expanding Role of Delta-like 4 Mediated Notch Signaling in Cardiovascular and Metabolic Diseases. *Circ. J. Off. J. Jpn. Circ. Soc.* 77, 2462.
- Fung, E., Tang, S.-M.T., Canner, J.P., Morishige, K., Arboleda-Velasquez, J.F., Cardoso, A.A., Carlesso, N., Aster, J.C., Aikawa, M., 2007. Delta-Like 4 Induces Notch Signaling in Macrophages: Implications for Inflammation. *Circulation* 115, 2948–2956. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.675462
- Fu, Y., Zhou, H., Wang, M., Cen, J., Wei, Q., 2014. Immune regulation and anti-inflammatory effects of isogarcinol extracted from *Garcinia mangostana* L. against collagen-induced arthritis. *J. Agric. Food Chem.* 62, 4127–4134. doi:10.1021/jf405790q

- Gainetdinov, R.R., Premont, R.T., Bohn, L.M., Lefkowitz, R.J., Caron, M.G., 2004. Desensitization of G protein-coupled receptors and neuronal functions. *Annu. Rev. Neurosci.* 27, 107–144. doi:10.1146/annurev.neuro.27.070203.144206
- Giral, M., Foucher, Y., Dufay, A., Van Huyen, J.P.D., Renaudin, K., Moreau, A., Philippe, A., Hegner, B., Dechend, R., Heidecke, H., Brouard, S., Cesbron, A., Castagnet, S., Devys, A., Souillou, J.P., Dragun, D., 2013. Pretransplant sensitization against angiotensin II type 1 receptor is a risk factor for acute rejection and graft loss. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* 13, 2567–2576. doi:10.1111/ajt.12397
- Gordon, S., Martinez, F.O., 2010. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity* 32, 593–604. doi:10.1016/j.immuni.2010.05.007
- Gururharsha, K.G., Kankel, M.W., Artavanis-Tsakonas, S., 2012. The Notch signalling system: recent insights into the complexity of a conserved pathway. *Nat. Rev. Genet.* 13, 654–666. doi:10.1038/nrg3272
- Haas, M., Sis, B., Racusen, L.C., Solez, K., Glotz, D., Colvin, R.B., Castro, M.C.R., David, D.S.R., David-Neto, E., Bagnasco, S.M., Cendales, L.C., Cornell, L.D., Demetris, A.J., Drachenberg, C.B., Farver, C.F., Farris, A.B., Gibson, I.W., Kraus, E., Liapis, H., Loupy, A., Nicleleit, V., Randhawa, P., Rodriguez, E.R., Rush, D., Smith, R.N., Tan, C.D., Wallace, W.D., Mengel, M., Banff meeting report writing committee, 2014. Banff 2013 meeting report: inclusion of c4d-negative antibody-mediated rejection and antibody-associated arterial lesions. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* 14, 272–283. doi:10.1111/ajt.12590
- Hammond, E.H., Yowell, R.L., Nunoda, S., Menlove, R.L., Renlund, D.G., Bristow, M.R., Gay, W.A., Jones, K.W., O'Connell, J.B., 1989. Vascular (humoral) rejection in heart transplantation: pathologic observations and clinical implications. *J. Heart Transplant.* 8, 430–443.
- Hammond, M.E.H., Revelo, M.P., Miller, D.V., Snow, G.L., Budge, D., Stehlik, J., Molina, K.M., Selzman, C.H., Drakos, S.G., Rami A, A., Nativi-Nicolau, J.N., Reid, B.B., Kfoury, A.G., 2016. ISHLT pathology antibody mediated rejection score correlates with increased risk of cardiovascular mortality: A retrospective validation analysis. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* 35, 320–325. doi:10.1016/j.healun.2015.10.035
- Hancock, W.W., Thomson, N.M., Atkins, R.C., 1983. Composition of interstitial cellular infiltrate identified by monoclonal antibodies in renal biopsies of rejecting human renal allografts. *Transplantation* 35, 458–463.
- Hay, A.-E., Hélesbeux, J.-J., Duval, O., Labaïed, M., Grellier, P., Richomme, P., 2004. Antimalarial xanthenes from *Calophyllum caldonicum* and *Garcinia vieillardii*. *Life Sci.* 75, 3077–3085. doi:10.1016/j.lfs.2004.07.009
- Herskowitz, A., Soule, L.M., Ueda, K., Tamura, F., Baumgartner, W.A., Borkon, A.M., Reitz, B.A., Achuff, S.C., Traill, T.A., Baughman, K.L., 1987. Arteriolar vasculitis on endomyocardial biopsy: a histologic predictor of poor outcome in cyclosporine-treated heart transplant recipients. *J. Heart Transplant.* 6, 127–136.

- Hiemann, N.E., Meyer, R., Wellnhofer, E., Schoenemann, C., Heidecke, H., Lachmann, N., Hetzer, R., Dragun, D., 2012. Non-HLA antibodies targeting vascular receptors enhance alloimmune response and microvasculopathy after heart transplantation. *Transplantation* 94, 919–924. doi:10.1097/TP.0b013e3182692ad2
- Hozumi, K., Mailhos, C., Negishi, N., Hirano, K., Yahata, T., Ando, K., Zuklys, S., Holländer, G.A., Shima, D.T., Habu, S., 2008. Delta-like 4 is indispensable in thymic environment specific for T cell development. *J. Exp. Med.* 205, 2507–2513. doi:10.1084/jem.20080134
- Issa, N., Cosio, F.G., Gloor, J.M., Sethi, S., Dean, P.G., Moore, S.B., DeGoey, S., Stegall, M.D., 2008. Transplant glomerulopathy: risk and prognosis related to anti-human leukocyte antigen class II antibody levels. *Transplantation* 86, 681–685. doi:10.1097/TP.0b013e3181837626
- Jackson, A.M., Kuperman, M.B., Montgomery, R.A., 2012. Multiple hyperacute rejections in the absence of detectable complement activation in a patient with endothelial cell reactive antibody. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* 12, 1643–1649. doi:10.1111/j.1600-6143.2011.03955.x
- Jackson, A.M., Sigdel, T.K., Delville, M., Hsieh, S.-C., Dai, H., Bagnasco, S., Montgomery, R.A., Sarwal, M.M., 2015. Endothelial Cell Antibodies Associated with Novel Targets and Increased Rejection. *J. Am. Soc. Nephrol.* 26, 1161–1171. doi:10.1681/ASN.2013121277
- Jakobsson, L., Franco, C.A., Bentley, K., Collins, R.T., Ponsioen, B., Aspalter, I.M., Rosewell, I., Busse, M., Thurston, G., Medvinsky, A., Schulte-Merker, S., Gerhardt, H., 2010. Endothelial cells dynamically compete for the tip cell position during angiogenic sprouting. *Nat. Cell Biol.* 12, 943–953. doi:10.1038/ncb2103
- Jenkins, D.W., Ross, S., Veldman-Jones, M., Foltz, I.N., Clavette, B.C., Manchulenko, K., Eberlein, C., Kendrew, J., Petteruti, P., Cho, S., Damschroder, M., Peng, L., Baker, D., Smith, N.R., Weir, H.M., Blakey, D.C., Bedian, V., Barry, S.T., 2012. MEDI0639: a novel therapeutic antibody targeting DLL4 modulates endothelial cell function and angiogenesis in vivo. *Mol. Cancer Ther.* 11, 1650–1660. doi:10.1158/1535-7163.MCT-11-1027
- Jiang, H., Harris, M.B., Rothman, P., 2000. IL-4/IL-13 signaling beyond JAK/STAT. *J. Allergy Clin. Immunol.* 105, 1063–1070.
- Jin, S., Mutvei, A.P., Chivukula, I.V., Andersson, E.R., Ramsköld, D., Sandberg, R., Lee, K.L., Kronqvist, P., Mamaeva, V., Östling, P., Mpindi, J.-P., Kallioniemi, O., Screpanti, I., Poellinger, L., Sahlgren, C., Lendahl, U., 2013. Non-canonical Notch signaling activates IL-6/JAK/STAT signaling in breast tumor cells and is controlled by p53 and IKK α /IKK β . *Oncogene* 32, 4892–4902. doi:10.1038/onc.2012.517
- Jose, M.D., Ikezumi, Y., van Rooijen, N., Atkins, R.C., Chadban, S.J., 2003. Macrophages act as effectors of tissue damage in acute renal allograft rejection. *Transplantation* 76, 1015–1022. doi:10.1097/01.TP.0000083507.67995.13
- Jurcevic, S., Ainsworth, M.E., Pomerance, A., Smith, J.D., Robinson, D.R., Dunn, M.J., Yacoub, M.H., Rose, M.L., 2001. Antivimentin antibodies are an independent predictor of

- transplant-associated coronary artery disease after cardiac transplantation. *Transplantation* 71, 886–892.
- Kalil, J., Guilherme, L., Neumann, J., Rosales, C., Marin, M., Saldanha, L., Chocair, P.R., Ianhez, L.E., Sabbaga, E., 1989. Humoral rejection in two HLA identical living related donor kidney transplants. *Transplant. Proc.* 21, 711–713.
- Karmann, K., Min, W., Fanslow, W.C., Poher, J.S., 1996. Activation and homologous desensitization of human endothelial cells by CD40 ligand, tumor necrosis factor, and interleukin 1. *J. Exp. Med.* 184, 173–182.
- Kelley, T.W., Graham, M.M., Doseff, A.I., Pomerantz, R.W., Lau, S.M., Ostrowski, M.C., Franke, T.F., Marsh, C.B., 1999. Macrophage colony-stimulating factor promotes cell survival through Akt/protein kinase B. *J. Biol. Chem.* 274, 26393–26398.
- Kirk, A.D., Mannon, R.B., Kleiner, D.E., Swanson, J.S., Kampen, R.L., Cendales, L.K., Elster, E.A., Wakefield, T., Chamberlain, C., Hoffmann, S.C., Hale, D.A., 2005. Results from a human renal allograft tolerance trial evaluating T-cell depletion with alemtuzumab combined with deoxyspergualin. *Transplantation* 80, 1051–1059.
- Kobashigawa, J., Crespo-Leiro, M.G., Ensminger, S.M., Reichenspurner, H., Angelini, A., Berry, G., Burke, M., Czer, L., Hiemann, N., Kfoury, A.G., Mancini, D., Mohacsi, P., Patel, J., Pereira, N., Platt, J.L., Reed, E.F., Reinsmoen, N., Rodriguez, E.R., Rose, M.L., Russell, S.D., Starling, R., Suciu-Foca, N., Tallaj, J., Taylor, D.O., Van Bakel, A., West, L., Zeevi, A., Zuckermann, A., Consensus Conference Participants, 2011. Report from a consensus conference on antibody-mediated rejection in heart transplantation. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* 30, 252–269. doi:10.1016/j.healun.2010.11.003
- Koch, U., Fiorini, E., Benedito, R., Besseyrias, V., Schuster-Gossler, K., Pierres, M., Manley, N.R., Duarte, A., Macdonald, H.R., Radtke, F., 2008. Delta-like 4 is the essential, nonredundant ligand for Notch1 during thymic T cell lineage commitment. *J. Exp. Med.* 205, 2515–2523. doi:10.1084/jem.20080829
- Koga, J., Nakano, T., Dahlman, J.E., Figueiredo, J.-L., Zhang, H., Decano, J., Khan, O.F., Niida, T., Iwata, H., Aster, J.C., others, 2015. Macrophage Notch Ligand Delta-Like 4 Promotes Vein Graft Lesion Development Implications for the Treatment of Vein Graft Failure. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 35, 2343–2353.
- Kopan, R., Ilagan, M.X.G., 2009. The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism. *Cell* 137, 216–233. doi:10.1016/j.cell.2009.03.045
- Krammer, P.H., 1999. CD95(APO-1/Fas)-mediated apoptosis: live and let die. *Adv. Immunol.* 71, 163–210.
- Krausgruber, T., Blazek, K., Smallie, T., Alzabin, S., Lockstone, H., Sahgal, N., Hussell, T., Feldmann, M., Udalova, I.A., 2011. IRF5 promotes inflammatory macrophage polarization and TH1-TH17 responses. *Nat. Immunol.* 12, 231–238. doi:10.1038/ni.1990
- Laky, K., Evans, S., Perez-Diez, A., Fowlkes, B.J., 2015. Notch signaling regulates antigen sensitivity of naive CD4+ T cells by tuning co-stimulation. *Immunity* 42, 80–94. doi:10.1016/j.immuni.2014.12.027

- Lardelli, M., Dahlstrand, J., Lendahl, U., 1994. The novel Notch homologue mouse Notch 3 lacks specific epidermal growth factor-repeats and is expressed in proliferating neuroepithelium. *Mech. Dev.* 46, 123–136.
- Lawrence, N., Langdon, T., Brennan, K., Arias, A.M., 2001. Notch signaling targets the Wingless responsiveness of a Ubx visceral mesoderm enhancer in *Drosophila*. *Curr. Biol. CB* 11, 375–385.
- Lawrence, T., Natoli, G., 2011. Transcriptional regulation of macrophage polarization: enabling diversity with identity. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 750–761. doi:10.1038/nri3088
- Le Bas-Bernardet, S., Hourmant, M., Coupel, S., Bignon, J.-D., Soulillou, J.-P., Charreau, B., 2003. Non-HLA-type endothelial cell reactive alloantibodies in pre-transplant sera of kidney recipients trigger apoptosis. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* 3, 167–177.
- Le Borgne, R., 2006. Regulation of Notch signalling by endocytosis and endosomal sorting. *Curr. Opin. Cell Biol.* 18, 213–222. doi:10.1016/j.ceb.2006.02.011
- Lefaucheur, C., Antoine, C., Suberbielle, C., Glotz, D., 2011. Mastering the risk of HLA antibodies in kidney transplantation: an algorithm based on pretransplant single-antigen flow bead techniques. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* 11, 1592–1598. doi:10.1111/j.1600-6143.2011.03560.x
- Lefaucheur, C., Loupy, A., Hill, G.S., Andrade, J., Nochy, D., Antoine, C., Gautreau, C., Charron, D., Glotz, D., Suberbielle-Boissel, C., 2010. Preexisting donor-specific HLA antibodies predict outcome in kidney transplantation. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 21, 1398–1406. doi:10.1681/ASN.2009101065
- Lekkou, A., Karakantza, M., Mouzaki, A., Kalfarentzos, F., Gogos, C.A., 2004. Cytokine production and monocyte HLA-DR expression as predictors of outcome for patients with community-acquired severe infections. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 11, 161–167.
- Ley, K., Reutershan, J., 2006. Leucocyte-endothelial interactions in health and disease. *Handb. Exp. Pharmacol.* 97–133.
- Liao, X., Sharma, N., Kapadia, F., Zhou, G., Lu, Y., Hong, H., Paruchuri, K., Mahabeleshwar, G.H., Dalmas, E., Venteclef, N., Flask, C.A., Kim, J., Doreian, B.W., Lu, K.Q., Kaestner, K.H., Hamik, A., Clément, K., Jain, M.K., 2011. Krüppel-like factor 4 regulates macrophage polarization. *J. Clin. Invest.* 121, 2736–2749. doi:10.1172/JCI45444
- Li, J.-L., Harris, A.L., 2009. Crosstalk of VEGF and Notch pathways in tumour angiogenesis: therapeutic implications. *Front. Biosci. Landmark Ed.* 14, 3094–3110.
- Li, J., Tu, Y., Tong, L., Zhang, W., Zheng, J., Wei, Q., 2010. Immunosuppressive activity on the murine immune responses of glycyrol from *Glycyrrhiza uralensis* via inhibition of calcineurin activity. *Pharm. Biol.* 48, 1177–1184. doi:10.3109/13880200903573169
- Lindsell, C.E., Shawber, C.J., Boulter, J., Weinmaster, G., 1995. Jagged: a mammalian ligand that activates Notch1. *Cell* 80, 909–917.
- Li, S., Wang, W., Fu, S., Wang, J., Liu, H., Xie, S., Liu, B., Li, Y., Lv, Q., Li, Z., Xue, W., Huang, B., Chen, W., Liu, J., 2013. IL-21 modulates release of proinflammatory cytokines in LPS-

- stimulated macrophages through distinct signaling pathways. *Mediators Inflamm.* 2013, 548073. doi:10.1155/2013/548073
- Loupy, A., Lefaucheur, C., Vernerey, D., Prugger, C., Duong van Huyen, J.-P., Mooney, N., Suberbielle, C., Frémeaux-Bacchi, V., Méjean, A., Desgrandchamps, F., Anglicheau, D., Nochy, D., Charron, D., Empana, J.-P., Delahousse, M., Legendre, C., Glotz, D., Hill, G.S., Zeevi, A., Jouven, X., 2013. Complement-binding anti-HLA antibodies and kidney-allograft survival. *N. Engl. J. Med.* 369, 1215–1226. doi:10.1056/NEJMoa1302506
- Loupy, A., Toquet, C., Rouvier, P., Beuscart, T., Bories, M.C., Varnous, S., Guillemain, R., Pattier, S., Suberbielle, C., Leprince, P., Lefaucheur, C., Jouven, X., Bruneval, P., Duong Van Huyen, J.P., 2016. Late Failing Heart Allografts: Pathology of Cardiac Allograft Vasculopathy and Association With Antibody-Mediated Rejection. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* 16, 111–120. doi:10.1111/ajt.13529
- Loupy, A., Vernerey, D., Tinel, C., Aubert, O., Duong van Huyen, J.-P., Rabant, M., Verine, J., Nochy, D., Empana, J.-P., Martinez, F., Glotz, D., Jouven, X., Legendre, C., Lefaucheur, C., 2015. Subclinical Rejection Phenotypes at 1 Year Post-Transplant and Outcome of Kidney Allografts. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 26, 1721–1731. doi:10.1681/ASN.2014040399
- Lubman, O.Y., Korolev, S.V., Kopan, R., 2004. Anchoring notch genetics and biochemistry; structural analysis of the ankyrin domain sheds light on existing data. *Mol. Cell* 13, 619–626.
- Luo, Y., Zhou, H., Krueger, J., Kaplan, C., Lee, S.-H., Dolman, C., Markowitz, D., Wu, W., Liu, C., Reisfeld, R.A., Xiang, R., 2006. Targeting tumor-associated macrophages as a novel strategy against breast cancer. *J. Clin. Invest.* 116, 2132–2141. doi:10.1172/JCI27648
- MacMicking, J., Xie, Q.W., Nathan, C., 1997. Nitric oxide and macrophage function. *Annu. Rev. Immunol.* 15, 323–350. doi:10.1146/annurev.immunol.15.1.323
- Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A., Locati, M., 2004. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* 25, 677–686. doi:10.1016/j.it.2004.09.015
- Martinez, F.O., Gordon, S., 2014. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000prime Rep.* 6, 13. doi:10.12703/P6-13
- Martinovic, I., Abegunewardene, N., Seul, M., Vosseler, M., Horstick, G., Buerke, M., Darius, H., Lindemann, S., 2005. Elevated monocyte chemoattractant protein-1 serum levels in patients at risk for coronary artery disease. *Circ. J. Off. J. Jpn. Circ. Soc.* 69, 1484–1489.
- Matsumoto, T., Takahashi, N., Kojima, T., Yoshioka, Y., Ishikawa, J., Furukawa, K., Ono, K., Sawada, M., Ishiguro, N., Yamamoto, A., 2016. Soluble Siglec-9 suppresses arthritis in a collagen-induced arthritis mouse model and inhibits M1 activation of RAW264.7 macrophages. *Arthritis Res. Ther.* 18, 133. doi:10.1186/s13075-016-1035-9
- Matsushita, K., Morrell, C.N., Cambien, B., Yang, S.X., Yamakuchi, M., Bao, C., Hara, M.R., Quick, R.A., Cao, W., O'Rourke, B., Lowenstein, J.M., Pevsner, J., Wagner, D.D.,

- Lowenstein, C.J., 2003. Nitric oxide regulates exocytosis by S-nitrosylation of N-ethylmaleimide-sensitive factor. *Cell* 115, 139–150.
- Merza, J., Mallet, S., Litaudon, M., Dumontet, V., Séraphin, D., Richomme, P., 2006. New cytotoxic guttiferone analogues from *Garcinia virgata* from New Caledonia. *Planta Med.* 72, 87–89. doi:10.1055/s-2005-873185
- Michaels, P.J., Espejo, M.L., Kobashigawa, J., Alejos, J.C., Burch, C., Takemoto, S., Reed, E.F., Fishbein, M.C., 2003. Humoral rejection in cardiac transplantation: risk factors, hemodynamic consequences and relationship to transplant coronary artery disease. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* 22, 58–69.
- Middleton, J., Neil, S., Wintle, J., Clark-Lewis, I., Moore, H., Lam, C., Auer, M., Hub, E., Rot, A., 1997. Transcytosis and surface presentation of IL-8 by venular endothelial cells. *Cell* 91, 385–395.
- Mills, C.D., Kincaid, K., Alt, J.M., Heilman, M.J., Hill, A.M., 2000. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 164, 6166–6173.
- Minter, L.M., Turley, D.M., Das, P., Shin, H.M., Joshi, I., Lawlor, R.G., Cho, O.H., Palaga, T., Gottipati, S., Telfer, J.C., Kostura, L., Fauq, A.H., Simpson, K., Such, K.A., Miele, L., Golde, T.E., Miller, S.D., Osborne, B.A., 2005. Inhibitors of gamma-secretase block in vivo and in vitro T helper type 1 polarization by preventing Notch upregulation of Tbx21. *Nat. Immunol.* 6, 680–688.
- Mitchell, J.A., Larkin, S., Williams, T.J., 1995. Cyclooxygenase-2: regulation and relevance in inflammation. *Biochem. Pharmacol.* 50, 1535–1542.
- Mohtashami, M., Shah, D.K., Nakase, H., Kianizad, K., Petrie, H.T., Zúñiga-Pflücker, J.C., 2010. Direct comparison of Dll1- and Dll4-mediated Notch activation levels shows differential lymphomyeloid lineage commitment outcomes. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 185, 867–876. doi:10.4049/jimmunol.1000782
- Mohtashami, M., Zúñiga-Pflücker, J.C., 2006. Three-dimensional architecture of the thymus is required to maintain delta-like expression necessary for inducing T cell development. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 176, 730–734.
- Montgomery, R.A., Cozzi, E., West, L.J., Warren, D.S., 2011. Humoral immunity and antibody-mediated rejection in solid organ transplantation. *Semin. Immunol.* 23, 224–234. doi:10.1016/j.smim.2011.08.021
- Mosser, D.M., Edwards, J.P., 2008. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 958–969. doi:10.1038/nri2448
- Napolitani, G., Rinaldi, A., Bertonni, F., Sallusto, F., Lanzavecchia, A., 2005. Selected Toll-like receptor agonist combinations synergistically trigger a T helper type 1-polarizing program in dendritic cells. *Nat. Immunol.* 6, 769–776. doi:10.1038/ni1223
- Nathan, C.F., Murray, H.W., Wiebe, M.E., Rubin, B.Y., 1983. Identification of interferon-gamma as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity. *J. Exp. Med.* 158, 670–689.
- Nayak, A., Pednekar, L., Reid, K.B.M., Kishore, U., 2012. Complement and non-complement activating functions of C1q: a prototypical innate immune molecule. *Innate Immun.* 18, 350–363. doi:10.1177/1753425910396252

- Neefjes, J., Jongsma, M.L.M., Paul, P., Bakke, O., 2011. Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 823–836. doi:10.1038/nri3084
- Niu, J., Profirovic, J., Pan, H., Vaiskunaite, R., 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. doi:10.1161/01.RES.0000097607.14733.0C
- Noguera-Troise, I., Daly, C., Papadopoulos, N.J., Coetzee, S., Boland, P., Gale, N.W., Lin, H.C., Yancopoulos, G.D., Thurston, G., 2006. Blockade of Dll4 inhibits tumour growth by promoting non-productive angiogenesis. *Nature* 444, 1032–1037. doi:10.1038/nature05355
- Noris, M., Remuzzi, G., 2013. Overview of Complement Activation and Regulation. *Semin. Nephrol.* 33, 479–492. doi:10.1016/j.semnephrol.2013.08.001
- Odegaard, J.I., Ricardo-Gonzalez, R.R., Goforth, M.H., Morel, C.R., Subramanian, V., Mukundan, L., Red Eagle, A., Vats, D., Brombacher, F., Ferrante, A.W., Chawla, A., 2007. Macrophage-specific PPARgamma controls alternative activation and improves insulin resistance. *Nature* 447, 1116–1120. doi:10.1038/nature05894
- Okajima, T., Matsuura, A., Matsuda, T., 2008. Biological functions of glycosyltransferase genes involved in O-fucose glycan synthesis. *J. Biochem. (Tokyo)* 144, 1–6. doi:10.1093/jb/mvn016
- Opelz, G., Collaborative Transplant Study, 2005. Non-HLA transplantation immunity revealed by lymphocytotoxic antibodies. *Lancet Lond. Engl.* 365, 1570–1576. doi:10.1016/S0140-6736(05)66458-6
- Ortiz-Masiá, D., Cosín-Roger, J., Calatayud, S., Hernández, C., Alós, R., Hinojosa, J., Esplugues, J.V., Barrachina, M.D., 2016. M1 Macrophages Activate Notch Signalling in Epithelial Cells: Relevance in Crohn's Disease. *J. Crohns Colitis* 10, 582–592. doi:10.1093/ecco-jcc/jjw009
- Osborne, B.A., Minter, L.M., 2007. Notch signalling during peripheral T-cell activation and differentiation. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 64–75. doi:10.1038/nri1998
- Pabois, A., Devallière, J., Quillard, T., Coulon, F., Gérard, N., Labois, C., Toquet, C., Charreau, B., 2014. The disintegrin and metalloproteinase ADAM10 mediates a canonical Notch-dependent regulation of IL-6 through Dll4 in human endothelial cells. *Biochem. Pharmacol.* 91, 510–521. doi:10.1016/j.bcp.2014.08.007
- Pabois, A., Pagie, S., Gérard, N., Labois, C., Pattier, S., Hulin, P., Nedellec, S., Toquet, C., Charreau, B., 2016. Notch signaling mediates crosstalk between endothelial cells and macrophages via Dll4 and IL6 in cardiac microvascular inflammation. *Biochem. Pharmacol.* 104, 95–107. doi:10.1016/j.bcp.2016.01.016
- Palmer, W.H., Jia, D., Deng, W.-M., 2014. Cis-interactions between Notch and its ligands block ligand-independent Notch activity. *eLife* 3. doi:10.7554/eLife.04415
- Pan, J., Xia, L., McEver, R.P., 1998. Comparison of promoters for the murine and human P-selectin genes suggests species-specific and conserved mechanisms for transcriptional regulation in endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 273, 10058–10067.

- Papadimitriou, J.C., Ramm, L.E., Drachenberg, C.B., Trump, B.F., Shin, M.L., 1991. Quantitative analysis of adenine nucleotides during the prelytic phase of cell death mediated by C5b-9. *J. Immunol. Baltim. Md* 147, 212–217.
- Parihar, A., Eubank, T.D., Doseff, A.I., 2010. Monocytes and Macrophages Regulate Immunity through Dynamic Networks of Survival and Cell Death. *J. Innate Immun.* 2, 204–215. doi:10.1159/000296507
- Petrache, I., Birukova, A., Ramirez, S.I., Garcia, J.G.N., 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. doi:10.1165/rcmb.2002-0075OC
- Pober, J.S., Cotran, R.S., 1990. The role of endothelial cells in inflammation. *Transplantation* 50, 537–544.
- Pober, J.S., Sessa, W.C., 2007. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 803–815. doi:10.1038/nri2171
- Poirault-Chassac, S., Six, E., Catelain, C., Lavergne, M., Villeval, J.-L., Vainchenker, W., Lauret, E., 2010. Notch/Delta4 signaling inhibits human megakaryocytic terminal differentiation. *Blood* 116, 5670–5678. doi:10.1182/blood-2010-05-285957
- Qi, F., Adair, A., Ferenbach, D., Vass, D.G., Mylonas, K.J., Kipari, T., Clay, M., Kluth, D.C., Hughes, J., Marson, L.P., 2008. Depletion of cells of monocyte lineage prevents loss of renal microvasculature in murine kidney transplantation. *Transplantation* 86, 1267–1274. doi:10.1097/TP.0b013e318188d433
- Quillard, T., Charreau, B., 2013. Impact of Notch Signaling on Inflammatory Responses in Cardiovascular Disorders. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 6863–6888. doi:10.3390/ijms14046863
- Quillard, T., Coupel, S., Coulon, F., Fitau, J., Chatelais, M., Cuturi, M.C., Chiffolleau, E., Charreau, B., 2008. Impaired Notch4 activity elicits endothelial cell activation and apoptosis: implication for transplant arteriosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 28, 2258–2265. doi:10.1161/ATVBAHA.108.174995
- Quillard, T., Devalliere, J., Chatelais, M., Coulon, F., Séveno, C., Romagnoli, M., Barillé Nion, S., Charreau, B., 2009. Notch2 Signaling Sensitizes Endothelial Cells to Apoptosis by Negatively Regulating the Key Protective Molecule Survivin. *PLoS ONE* 4, e8244. doi:10.1371/journal.pone.0008244
- Quillard, T., Devallière, J., Coupel, S., Charreau, B., 2010. Inflammation dysregulates Notch signaling in endothelial cells: Implication of Notch2 and Notch4 to endothelial dysfunction. *Biochem. Pharmacol.* 80, 2032–2041. doi:10.1016/j.bcp.2010.07.010
- Raad, I., Terreux, R., Richomme, P., Matera, E.-L., Dumontet, C., Raynaud, J., Guilet, D., 2006. Structure-activity relationship of natural and synthetic coumarins inhibiting the multidrug transporter P-glycoprotein. *Bioorg. Med. Chem.* 14, 6979–6987. doi:10.1016/j.bmc.2006.06.026
- Racusen, L.C., Haas, M., 2006. Antibody-mediated rejection in renal allografts: lessons from pathology. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol. CJASN* 1, 415–420. doi:10.2215/CJN.01881105
- Radtke, F., MacDonald, H.R., Tacchini-Cottier, F., 2013. Regulation of innate and adaptive immunity by Notch. *Nat. Rev. Immunol.* 13, 427–437. doi:10.1038/nri3445

- Radtke, F., Raj, K., 2003. The role of Notch in tumorigenesis: oncogene or tumour suppressor? *Nat. Rev. Cancer* 3, 756–767. doi:10.1038/nrc1186
- Raya, A., Kawakami, Y., Rodríguez-Esteban, C., Ibañes, M., Rasskin-Gutman, D., Rodríguez-León, J., Büscher, D., Feijó, J.A., Izpisua Belmonte, J.C., 2004. Notch activity acts as a sensor for extracellular calcium during vertebrate left-right determination. *Nature* 427, 121–128. doi:10.1038/nature02190
- Revelo, M.P., Miller, D.V., Stehlik, J., Brunisholz, K., Drakos, S., Gilbert, E.M., Everitt, M., Budge, D., Alharethi, R., Snow, G., Hammond, E.H., Kfoury, A.G., 2012. Longitudinal evaluation of microvessel density in survivors vs. nonsurvivors of cardiac pathologic antibody-mediated rejection. *Cardiovasc. Pathol. Off. J. Soc. Cardiovasc. Pathol.* 21, 445–454. doi:10.1016/j.carpath.2012.01.004
- Ridgway, J., Zhang, G., Wu, Y., Stawicki, S., Liang, W.-C., Chanthery, Y., Kowalski, J., Watts, R.J., Callahan, C., Kasman, I., Singh, M., Chien, M., Tan, C., Hongo, J.-A.S., de Sauvage, F., Plowman, G., Yan, M., 2006. Inhibition of Dll4 signalling inhibits tumour growth by deregulating angiogenesis. *Nature* 444, 1083–1087. doi:10.1038/nature05313
- Riella, L.V., Ueno, T., Batal, I., De Serres, S.A., Bassil, R., Elyaman, W., Yagita, H., Medina-Pestana, J.O., Chandraker, A., Najafian, N., 2011. Blockade of Notch ligand $\delta 1$ promotes allograft survival by inhibiting alloreactive Th1 cells and cytotoxic T cell generation. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 187, 4629–4638. doi:10.4049/jimmunol.1004076
- Rocher, C., Singla, D.K., 2013. SMAD-PI3K-Akt-mTOR pathway mediates BMP-7 polarization of monocytes into M2 macrophages. *PloS One* 8, e84009. doi:10.1371/journal.pone.0084009
- Rószter, T., 2015. Understanding the Mysterious M2 Macrophage through Activation Markers and Effector Mechanisms. *Mediators Inflamm.* 2015, 816460. doi:10.1155/2015/816460
- Rouger, C., Derbré, S., Charreau, B., Pabois, A., Cauchy, T., Litaudon, M., Awang, K., Richomme, P., 2015. Lepidotol A from *Mesua lepidota* Inhibits Inflammatory and Immune Mediators in Human Endothelial Cells. *J. Nat. Prod.* 78, 2187–2197. doi:10.1021/acs.jnatprod.5b00222
- Sainson, R.C.A., Johnston, D.A., Chu, H.C., Holderfield, M.T., Nakatsu, M.N., Crampton, S.P., Davis, J., Conn, E., Hughes, C.C.W., 2008. TNF primes endothelial cells for angiogenic sprouting by inducing a tip cell phenotype. *Blood* 111, 4997–5007. doi:10.1182/blood-2007-08-108597
- Salehi, S., Reed, E.F., 2015. The Divergent Roles of Macrophages in Solid Organ Transplantation. *Curr. Opin. Organ Transplant.* 20, 446–453. doi:10.1097/MOT.0000000000000209
- Sandy, A.R., Chung, J., Toubai, T., Shan, G.T., Tran, I.T., Friedman, A., Blackwell, T.S., Reddy, P., King, P.D., Maillard, I., 2013. T cell-specific notch inhibition blocks graft-versus-host disease by inducing a hyporesponsive program in alloreactive CD4+ and CD8+ T cells. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 190, 5818–5828. doi:10.4049/jimmunol.1203452
- Sangphech, N., Osborne, B.A., Palaga, T., 2014. Notch signaling regulates the phosphorylation of Akt and survival of lipopolysaccharide-activated macrophages via

- regulator of G protein signaling 19 (RGS19). *Immunobiology* 219, 653–660. doi:10.1016/j.imbio.2014.03.020
- Santa-Cecília, F.V., Freitas, L.A.S., Vilela, F.C., Veloso, C. de C., da Rocha, C.Q., Moreira, M.E.C., Dias, D.F., Giusti-Paiva, A., dos Santos, M.H., 2011. Antinociceptive and anti-inflammatory properties of 7-epiclusianone, a prenylated benzophenone from *Garcinia brasiliensis*. *Eur. J. Pharmacol.* 670, 280–285. doi:10.1016/j.ejphar.2011.08.032
- Satoh, T., Takeuchi, O., Vandenbon, A., Yasuda, K., Tanaka, Y., Kumagai, Y., Miyake, T., Matsushita, K., Okazaki, T., Saitoh, T., Honma, K., Matsuyama, T., Yui, K., Tsujimura, T., Standley, D.M., Nakanishi, K., Nakai, K., Akira, S., 2010. The Jmjd3-Irf4 axis regulates M2 macrophage polarization and host responses against helminth infection. *Nat. Immunol.* 11, 936–944. doi:10.1038/ni.1920
- Savill, J., Fadok, V., 2000. Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature* 407, 784–788. doi:10.1038/35037722
- Scehnet, J.S., Jiang, W., Kumar, S.R., Krasnoperov, V., Trindade, A., Benedito, R., Djokovic, D., Borges, C., Ley, E.J., Duarte, A., Gill, P.S., 2007. Inhibition of DLL4-mediated signaling induces proliferation of immature vessels and results in poor tissue perfusion. *Blood* 109, 4753–4760. doi:10.1182/blood-2006-12-063933
- Schenkel, A.R., Mamdouh, Z., Chen, X., Liebman, R.M., Muller, W.A., 2002. CD99 plays a major role in the migration of monocytes through endothelial junctions. *Nat. Immunol.* 3, 143–150. doi:10.1038/ni749
- Schmidt, A., Sucke, J., Fuchs-Moll, G., Freitag, P., Hirschburger, M., Kaufmann, A., Garn, H., Padberg, W., Grau, V., 2007. Macrophages in experimental rat lung isografts and allografts: infiltration and proliferation in situ. *J. Leukoc. Biol.* 81, 186–194. doi:10.1189/jlb.0606377
- Sessa, W.C., 2004. eNOS at a glance. *J. Cell Sci.* 117, 2427–2429. doi:10.1242/jcs.01165
- Shawber, C., Boulter, J., Lindsell, C.E., Weinmaster, G., 1996. Jagged2: a serrate-like gene expressed during rat embryogenesis. *Dev. Biol.* 180, 370–376. doi:10.1006/dbio.1996.0310
- Shutter, J.R., Scully, S., Fan, W., Richards, W.G., Kitajewski, J., DeBlandre, G.A., Kintner, C.R., Stark, K.L., 2000. DLL4, a novel Notch ligand expressed in arterial endothelium. *Genes Dev.* 14, 1313–1318.
- Sica, A., Mantovani, A., 2012. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J. Clin. Invest.* 122, 787–795. doi:10.1172/JCI59643
- Sierra-Filardi, E., Puig-Kröger, A., Blanco, F.J., Nieto, C., Bragado, R., Palomero, M.I., Bernabéu, C., Vega, M.A., Corbí, A.L., 2011. Activin A skews macrophage polarization by promoting a proinflammatory phenotype and inhibiting the acquisition of anti-inflammatory macrophage markers. *Blood* 117, 5092–5101. doi:10.1182/blood-2010-09-306993
- Smith, J.D., Banner, N.R., Hamour, I.M., Ozawa, M., Goh, A., Robinson, D., Terasaki, P.I., Rose, M.L., 2011. De novo donor HLA-specific antibodies after heart transplantation are an independent predictor of poor patient survival. *Am. J. Transplant. Off. J. Am.*

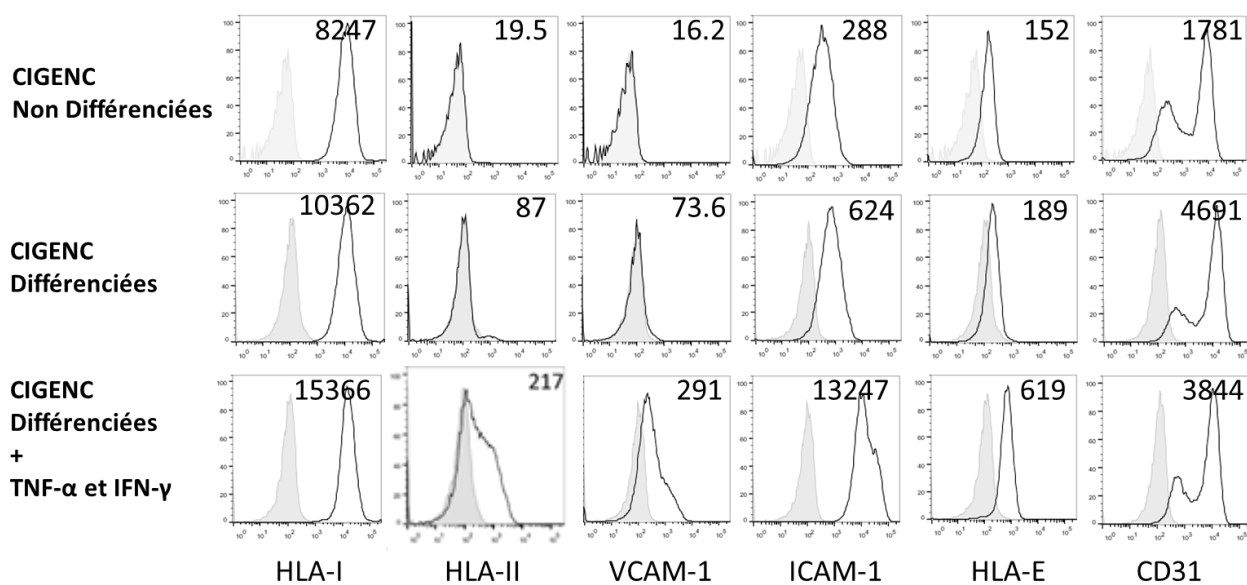
- Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg. 11, 312–319. doi:10.1111/j.1600-6143.2010.03383.x
- Sorensen, E.B., Conner, S.D., 2010. γ -secretase-dependent cleavage initiates notch signaling from the plasma membrane. *Traffic Cph. Den.* 11, 1234–1245. doi:10.1111/j.1600-0854.2010.01090.x
- Stegall, M.D., Chedid, M.F., Cornell, L.D., 2012. The role of complement in antibody-mediated rejection in kidney transplantation. *Nat. Rev. Nephrol.* 8, 670–678. doi:10.1038/nrneph.2012.212
- Stein, M., Keshav, S., Harris, N., Gordon, S., 1992. Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *J. Exp. Med.* 176, 287–292.
- Stevens, T., Garcia, J.G., Shasby, D.M., Bhattacharya, J., Malik, A.B., 2000. Mechanisms regulating endothelial cell barrier function. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 279, L419–422.
- Suchting, S., Freitas, C., le Noble, F., Benedito, R., Bréant, C., Duarte, A., 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. doi:10.1073/pnas.0611177104
- Sumitran-Holgersson, S., Wilczek, H.E., Holgersson, J., Söderström, K., 2002. Identification of the nonclassical HLA molecules, mica, as targets for humoral immunity associated with irreversible rejection of kidney allografts. *Transplantation* 74, 268–277.
- Sun, J., Krawczyk, C.J., Pearce, E.J., 2008. Suppression of Th2 cell development by Notch ligands Delta1 and Delta4. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 180, 1655–1661.
- Takeda, N., O’Dea, E.L., Doedens, A., Kim, J., Weidemann, A., Stockmann, C., Asagiri, M., Simon, M.C., Hoffmann, A., Johnson, R.S., 2010. Differential activation and antagonistic function of HIF- α isoforms in macrophages are essential for NO homeostasis. *Genes Dev.* 24, 491–501. doi:10.1101/gad.1881410
- Takeiri, M., Tachibana, M., Kaneda, A., Ito, A., Ishikawa, Y., Nishiyama, S., Goto, R., Yamashita, K., Shibasaki, S., Hirokata, G., Ozaki, M., Todo, S., Umezawa, K., 2011. Inhibition of macrophage activation and suppression of graft rejection by DTCM-glutarimide, a novel piperidine derived from the antibiotic 9-methylstreptimidone. *Inflamm. Res. Off. J. Eur. Histamine Res. Soc. Al* 60, 879–888. doi:10.1007/s00011-011-0348-z
- Tanaka, S., Sakata, Y., Morimoto, K., Tambe, Y., Watanabe, Y., Honda, G., Tabata, M., Oshima, T., Masuda, T., Umezawa, T., Shimada, M., Nagakura, N., Kamisako, W., Kashiwada, Y., Ikeshiro, Y., 2001. Influence of natural and synthetic compounds on cell surface expression of cell adhesion molecules, ICAM-1 and VCAM-1. *Planta Med.* 67, 108–113. doi:10.1055/s-2001-11514
- Taylor, P.R., Martinez-Pomares, L., Stacey, M., Lin, H.-H., Brown, G.D., Gordon, S., 2005. Macrophage receptors and immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 23, 901–944. doi:10.1146/annurev.immunol.23.021704.115816

- Tegla, C.A., Cudrici, C., Patel, S., Trippe, R., Rus, V., Niculescu, F., Rus, H., 2011. Membrane attack by complement: the assembly and biology of terminal complement complexes. *Immunol. Res.* 51, 45–60. doi:10.1007/s12026-011-8239-5
- Thauland, T.J., Butte, M.J., 2015. Taking T cell priming down a Notch: signaling through Notch receptors enhances T cell sensitivity to antigen. *Immunity* 42, 6–8. doi:10.1016/j.immuni.2014.12.026
- Thurston, G., Noguera-Troise, I., Yancopoulos, G.D., 2007. The Delta paradox: DLL4 blockade leads to more tumour vessels but less tumour growth. *Nat. Rev. Cancer* 7, 327–331. doi:10.1038/nrc2130
- Tinckam, K.J., Djurdjev, O., Magil, A.B., 2005. Glomerular monocytes predict worse outcomes after acute renal allograft rejection independent of C4d status. *Kidney Int.* 68, 1866–1874. doi:10.1111/j.1523-1755.2005.00606.x
- Tonnerre, P., Gérard, N., Chatelais, M., Poli, C., Allard, S., Cury, S., Bressollette, C., Cesbron-Gautier, A., Charreau, B., 2013. MICA variant promotes allosensitization after kidney transplantation. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 24, 954–966. doi:10.1681/ASN.2012080814
- Toshchakov, V., Jones, B.W., Perera, P.-Y., Thomas, K., Cody, M.J., Zhang, S., Williams, B.R.G., Major, J., Hamilton, T.A., Fenton, M.J., Vogel, S.N., 2002. TLR4, but not TLR2, mediates IFN-beta-induced STAT1alpha/beta-dependent gene expression in macrophages. *Nat. Immunol.* 3, 392–398. doi:10.1038/ni774
- Tran, I.T., Sandy, A.R., Carulli, A.J., Ebens, C., Chung, J., Shan, G.T., Radojcic, V., Friedman, A., Gridley, T., Shelton, A., Reddy, P., Samuelson, L.C., Yan, M., Siebel, C.W., Maillard, I., 2013. Blockade of individual Notch ligands and receptors controls graft-versus-host disease. *J. Clin. Invest.* 123, 1590–1604. doi:10.1172/JCI65477
- Uyttendaele, H., Marazzi, G., Wu, G., Yan, Q., Sassoon, D., Kitajewski, J., 1996. Notch4/int-3, a mammary proto-oncogene, is an endothelial cell-specific mammalian Notch gene. *Dev. Camb. Engl.* 122, 2251–2259.
- Valenzuela, N.M., Hong, L., Shen, X.-D., Gao, F., Young, S.H., Rozengurt, E., Kupiec-Weglinski, J.W., Fishbein, M.C., Reed, E.F., 2013. Blockade of p-selectin is sufficient to reduce MHC I antibody-elicited monocyte recruitment in vitro and in vivo. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* 13, 299–311. doi:10.1111/ajt.12016
- van den Bosch, M.H., Blom, A.B., Schelbergen, R.F., Koenders, M.I., van de Loo, F.A., van den Berg, W.B., Vogl, T., Roth, J., van der Kraan, P.M., van Lent, P.L., 2016. Alarmin S100A9 Induces Proinflammatory and Catabolic Effects Predominantly in the M1 Macrophages of Human Osteoarthritic Synovium. *J. Rheumatol.* doi:10.3899/jrheum.160270
- van Furth, R., Cohn, Z.A., 1968. The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. *J. Exp. Med.* 128, 415–435.
- Waldburger, J.M., Suter, T., Fontana, A., Acha-Orbea, H., Reith, W., 2001. Selective abrogation of major histocompatibility complex class II expression on extrahematopoietic cells in mice lacking promoter IV of the class II transactivator gene. *J. Exp. Med.* 194, 393–406.

- Wallace, W.D., Weigt, S.S., Farver, C.F., 2014. Update on pathology of antibody-mediated rejection in the lung allograft. *Curr. Opin. Organ Transplant.* 19, 303–308. doi:10.1097/MOT.0000000000000079
- Wang, Y.-C., He, F., Feng, F., Liu, X.-W., Dong, G.-Y., Qin, H.-Y., Hu, X.-B., Zheng, M.-H., Liang, L., Feng, L., Liang, Y.-M., Han, H., 2010. Notch Signaling Determines the M1 versus M2 Polarization of Macrophages in Antitumor Immune Responses. *Cancer Res.* 70, 4840–4849. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-0269
- Watson, C.A., Petzelbauer, P., Zhou, J., Pardi, R., Bender, J.R., 1995. Contact-dependent endothelial class II HLA gene activation induced by NK cells is mediated by IFN-gamma-dependent and -independent mechanisms. *J. Immunol. Baltim. Md* 150, 3222–3233.
- Weinmaster, G., Roberts, V.J., Lemke, G., 1992. Notch2: a second mammalian Notch gene. *Dev. Camb. Engl.* 116, 931–941.
- Wilson, J.J., Kovall, R.A., 2006. Crystal structure of the CSL-Notch-Mastermind ternary complex bound to DNA. *Cell* 124, 985–996. doi:10.1016/j.cell.2006.01.035
- Wolfe, M.S., Kopan, R., 2004. Intramembrane proteolysis: theme and variations. *Science* 305, 1119–1123. doi:10.1126/science.1096187
- Wongchana, W., Palaga, T., 2012. Direct regulation of interleukin-6 expression by Notch signaling in macrophages. *Cell. Mol. Immunol.* 9, 155–162. doi:10.1038/cmi.2011.36
- Wood, S., Feng, J., Chung, J., Radojicic, V., Sandy-Sloat, A.R., Friedman, A., Shelton, A., Yan, M., Siebel, C.W., Bishop, D.K., Maillard, I., 2015. Transient blockade of delta-like Notch ligands prevents allograft rejection mediated by cellular and humoral mechanisms in a mouse model of heart transplantation. *J. Immunol. Baltim. Md* 194, 2899–2908. doi:10.4049/jimmunol.1402034
- Wu, G.W., Kobashigawa, J.A., Fishbein, M.C., Patel, J.K., Kittleson, M.M., Reed, E.F., Kiyosaki, K.K., Ardehali, A., 2009. Asymptomatic antibody-mediated rejection after heart transplantation predicts poor outcomes. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* 28, 417–422. doi:10.1016/j.healun.2009.01.015
- Xu, H., Zhu, J., Smith, S., Foldi, J., Zhao, B., Chung, A.Y., Outtz, H., Kitajewski, J., Shi, C., Weber, S., Saftig, P., Li, Y., Ozato, K., Blobel, C.P., Ivashkiv, L.B., Hu, X., 2012. Notch-RBP-J signaling regulates the transcription factor IRF8 to promote inflammatory macrophage polarization. *Nat. Immunol.* 13, 642–650. doi:10.1038/ni.2304
- Yashiro-Ohtani, Y., He, Y., Ohtani, T., Jones, M.E., Shestova, O., Xu, L., Fang, T.C., Chiang, M.Y., Intlekofer, A.M., Blacklow, S.C., Zhuang, Y., Pear, W.S., 2009. Pre-TCR signaling inactivates Notch1 transcription by antagonizing E2A. *Genes Dev.* 23, 1665–1676. doi:10.1101/gad.1793709
- Zavoico, G.B., Ewenstein, B.M., Schafer, A.I., Pober, J.S., 1989. IL-1 and related cytokines enhance thrombin-stimulated PGI₂ production in cultured endothelial cells without affecting thrombin-stimulated von Willebrand factor secretion or platelet-activating factor biosynthesis. *J. Immunol. Baltim. Md* 142, 3993–3999.

- Zeng, C., Xing, R., Liu, J., Xing, F., 2016. Role of CSL-dependent and independent Notch signaling pathways in cell apoptosis. *Apoptosis Int. J. Program. Cell Death* 21, 1–12. doi:10.1007/s10495-015-1188-z
- Zhang, J., Fukuhara, S., Sako, K., Takenouchi, T., Kitani, H., Kume, T., Koh, G.Y., Mochizuki, N., 2011. Angiopoietin-1/Tie2 signal augments basal Notch signal controlling vascular quiescence by inducing delta-like 4 expression through AKT-mediated activation of beta-catenin. *J. Biol. Chem.* 286, 8055–8066. doi:10.1074/jbc.M110.192641
- Zhang, Y., Sandy, A.R., Wang, J., Radojcic, V., Shan, G.T., Tran, I.T., Friedman, A., Kato, K., He, S., Cui, S., Hexner, E., Frank, D.M., Emerson, S.G., Pear, W.S., Maillard, I., 2011. Notch signaling is a critical regulator of allogeneic CD4+ T-cell responses mediating graft-versus-host disease. *Blood* 117, 299–308. doi:10.1182/blood-2010-03-271940
- Zheng, X.-J., Yang, Z.-X., Dong, Y.-J., Zhang, G.-Y., Sun, M.-F., An, X.-K., Pan, L.-H., Zhang, S.-L., 2016. Downregulation of leptin inhibits growth and induces apoptosis of lung cancer cells via the Notch and JAK/STAT3 signaling pathways. *Biol. Open* 5, 794–800. doi:10.1242/bio.017798
- Ziegler, M.E., Souda, P., Jin, Y.-P., Whitelegge, J.P., Reed, E.F., 2012. Characterization of the endothelial cell cytoskeleton following HLA class I ligation. *PloS One* 7, e29472. doi:10.1371/journal.pone.0029472
- Zolkiewska, A., 2008. ADAM proteases: ligand processing and modulation of the Notch pathway. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 65, 2056–2068. doi:10.1007/s00018-008-7586-4

ANNEXES



Annexe 1 : Phénotype complet réalisé sur les cellules endothéliales microvasculaires glomérulaires (CiGenc) non différenciées, différenciées, différenciées et activées par le TNF- α et l'IFN- γ . Les résultats sont exprimés sous formes d'histogrammes et la valeur de la moyenne géométrique obtenue est indiquée.

Production scientifique

Articles

Notch signaling mediates crosstalk between endothelial cells and macrophages via DLL4 and IL-6 in cardiac microvascular inflammation

Sylvain Pagie, Angélique Pabois, Nathalie Gérard, Christian Labois, Sabine Pattier, Toquet, Philippe Hulin, Steven Nedellec, Claire Toquet et Béatrice Charreau.

Article publié dans Biochemical Pharmacology

DLL4: a death ligand controlling M2 macrophage differentiation and apoptosis

Sylvain Pagie, Nathalie Gérard et Béatrice Charreau

Article en preparation

Prenylated Polyphenols from *Clusiaceae* and *Calophyllaceae* with Immunomodulator Activity on Endothelial Cells

Caroline Rouger, Sylvain Pagie, Séverine Derbré, Anne-Marie Le Ray, Pascal Richomme and Béatrice Charreau.

Article soumis au journal Plos One

Communications Orales

ENDOTHELIAL CELLS polarize INTRAVASCULAR MACROPHAGES into PROINFLAMMATORY M1 via NOTCH SIGNALING, DLL4 and IL-6 in CARDIAC TRANSPLANTS during ANTIBODY-MEDIATED REJECTION. Sylvain Pagie, Angélique Pabois, Claire Toquet, Nathalie Gérard, Christian Labois, Sabine Pattier, Philippe Hulin, Steven Nedellec and Béatrice Charreau, 17th ESOT congress, Bruxelles, Septembre 2015.

Activation de l'endothélium du greffon cardiaque au cours du rejet humoral aigu : Implication de la voie Notch dans la polarisation des macrophages intravasculaires en macrophages pro-inflammatoires de type M1. Sylvain Pagie, Angélique Paboïs, Claire Toquet, Nathalie Gérard, Christian Laboisse, Sabine Pattier, Philippe Hulin, Steven Nedellec and Béatrice Charreau, Société Française de Pathologie, Paris, Novembre 2015.

Posters

SH2B adaptors are regulatory signaling proteins controlling microvascular inflammation upon antibody-mediated rejection of cardiac transplants. Sylvain Pagie, Claire Toquet, Sabine Pattier, Nathalie Gérard, Christian Laboisse and Béatrice Charreau, 17th ESOT congress, Bruxelles, Septembre 2015.

SH2B adaptors are regulatory signaling proteins controlling microvascular inflammation upon antibody-mediated rejection of cardiac transplants. Sylvain Pagie, Claire Toquet, Sabine Pattier, Nathalie Gérard, Christian Laboisse and Béatrice Charreau, Société Française de Pathologie, Paris, Novembre 2015.

Chemically engineered extracts of St John's wort as sources of polyprenylated acylphloroglucinols to prevent endothelial dysfunction. Maxime Le Bot, Nina Corlay, Aurore Michaud, Sylvain Pagie, Pascal Richomme, Béatrice Charreau, Séverine Derbré, Joint Natural Products Conference, Copenhagen, 2016.

Thèse de Doctorat

Sylvain PAGIE

Mécanismes effecteurs du rejet aigu humoral : Contribution de la voie Notch et du ligand Dll4 à l'interface endothélium/macrophages et à la polarisation des macrophages.

Effector mechanisms of acute humoral rejection: Contribution of the Notch signaling pathway and of Dll4 to the endothelium/macrophages crosstalk and to macrophages polarization

Résumé

Le rejet aigu humoral (RAH) est une complication post-transplantation qui peut conduire à la dysfonction puis la perte du greffon. Le RAH est caractérisé, au niveau histologique, par la présence de lésions endothéliales et d'un infiltrat de macrophages intravasculaires. Cette étude avait pour objectif d'identifier les mécanismes et voies de signalisation impliqués dans l'altération des cellules endothéliales (CE) au cours du RAH et de nouvelles molécules régulatrices. Nous montrons que l'induction du ligand de la voie Notch Dll4 dans les CE et les macrophages est caractéristique du RAH dans les greffons cardiaques. L'expression endothéliale de Dll4 et la sécrétion de l'IL-6 par les CE induit la polarisation des macrophages vers un profil pro-inflammatoire de type M1. Nous identifions aussi Dll4 comme un régulateur négatif et pro-apoptotique de la différenciation vers un phénotype suppressif de type M2. Nous montrons que les cellules microvasculaires sont les cibles cellulaires privilégiées des anticorps non HLA préformés associés à certains RAH en transplantation rénale. Enfin, nous avons mis en évidence l'activité d'une famille de coumarines issues de végétaux sur l'expression endothéliale de molécules de l'inflammation et de l'immunité. Pour conclure, notre étude montre l'importance de la voie Notch dans l'inflammation liée au RAH et identifie Dll4 et IL-6 comme de nouveaux médiateurs de l'inflammation et d'une interaction spatiale et fonctionnelle des CE et des macrophages. Ces travaux proposent donc Dll4 et l'IL-6 comme des cibles moléculaires et les coumarines comme nouvelles molécules bioactives pour le contrôle de l'inflammation et du RAH en transplantation.

Mots clés : Dll4 ; Cellules endothéliales ; Rejet aigu humoral ; Polarisation des macrophages

Abstract

Acute humoral rejection (RAH) is a post-transplant complication that can lead to dysfunction and graft loss. RAH is characterized histologically by the presence of endothelial lesions and of an infiltrate of intravascular macrophages. This study aimed to identify the mechanisms, the signaling pathways involved in the alteration of endothelial cells (EC) upon RAH as well as new regulatory molecules for therapeutic approaches. Here, we show that the induction of the Notch ligand Dll4 in both the EC and macrophages is a feature of RAH in cardiac allografts. The expression of Dll4 and secretion of IL-6 induced polarization of macrophages into proinflammatory M1-type. We further identify Dll4 as a negative and pro-apoptotic regulator of macrophage differentiation towards a suppressive phenotype M2-type. We found that glomerular microvascular cells are the cell targets of preformed non HLA antibodies causing RAH in kidney transplantation. Finally, we have demonstrated the inhibitory activity of a series of coumarins issued from plants on the endothelial expression of a panel of inflammation and immunity molecules. In conclusion, our study shows the importance of the Notch pathway in inflammation-related RAH and identifies Dll4 and IL-6 as new mediators of inflammation and spatial and functional interaction of the EC and macrophages. This work therefore propose Dll4 and IL-6 as molecular targets and coumarins as new bioactive molecules for the control of inflammation and RAH.

Key Words: Dll4 ; Endothelial cells ; Acute humoral rejection; Macrophages polarization