HAL
open science

Rôle de la voie de signalisation de Notch3 dans le myocarde adulte

Hélène Ragot

To cite this version:

Hélène Ragot. Rôle de la voie de signalisation de Notch3 dans le myocarde adulte. Cardiologie et système cardiovasculaire. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2016. Français. NNT : 2016PA066323 . tel-01474900

HAL Id: tel-01474900

https://theses.hal.science/tel-01474900

Submitted on 23 Feb 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université Pierre et Marie Curie

Ecole doctorale Physiologie, physiopathologie et thérapeutique

THESE

Pour l'obtention du grade de :

DOCTEUR de L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE

Rôle de la voie de signalisation de Notch3 dans le myocarde adulte

Présentée par Hélène RAGOT

Soutenue le lundi 19 septembre 2016, devant le jury composé de :

M. le Professeur Onnik Agbulut	Président
Mme le Professeur Nathalie Janel	Rapporteur
M. le docteur Patrick Lacolley	Rapporteur
Mme le docteur Catherine Monnot	Examinatrice
M. le docteur Antoine Ouvrard-Pascaud	Examinateur
M. le docteur Christos Chatziantoniou	Co-directeur de thèse
Mme le docteur Jane-Lise Samuel	Co-directrice de thèse

Except where otherwise noted, this work is licensed under
http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/

Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier les membres du jury qui ont accepté de juger mon travail de thèse, le professeur Onnik Agbulut, président du jury, madame le professeur Nathalie Janel et le docteur Patrick Lacolley, en qualité de rapporteurs et les docteurs Catherine Monnot et Antoine Ouvrad-Pascaud, en qualité d'examinateurs.

Un grand merci à Jane-Lise Samuel, ma directrice de thèse, de m'avoir supervisée durant ces 5 années à Lariboisière. Merci pour votre confiance et vos encouragements. Vous avez su vous montrer disponible et à l'écoute de mes questions dans les moments difficiles. Vous m'avez appris à me surpasser à l'oral (et il y avait du boulot !), ce qui m'a permis d'accéder à cette thèse, et je vous en remercie infiniment… Vos petites anecdotes et vos « coucou toi » vont me manquer…

Je remercie également Christos Chatziantoniou, mon co-directeur de thèse, pour m'avoir co-encadrée dans l'analyse de ces souris Notch. Les petites réunions matinales à Tenon m'ont permis de progresser dans mon travail grâce à votre sens critique et votre expertise sur Notch3. Merci également à Falah et à Zela pour leur aide dans mon projet.

Merci à Claude Delcayre, de m'avoir accueillie au sein du laboratoire. Un petit mail envoyé un soir pour un stage de M1 et vous répondiez le lendemain qu' « il y avait une place pour moi au sein du labo »… et me voilà 6 ans plus tard. Je vous remercie pour nos discussions scientifiques sur ces souris qui mouraient et dont nous ne comprenions pas grand-chose au début. Merci pour votre humour et pour les bons moments en congrès tous ensemble.

Je remercie le Professeur Alain Cohen-Solal pour m'avoir intégrée au sein de l'unité. Merci à tous les cliniciens de l'unité pour m'avoir fait découvrir la recherche clinique sur les biomarqueurs au cours de nos réunions du lundi midi.

Merci à tous les membres de la U942 mais surtout ceux sans qui ces années n'auraient pas été les mêmes…

A Fériel et Loubina, mes deux mentors ! Vous avez été toutes les deux des modèles pour moi, petite « gremlins » fraichement arrivée. Merci de m'avoir fait découvrir la vie du laboratoire, de m'avoir encadrée et soutenue durant mes stages et l'année pré-thèse, mais surtout pour tous les bons moments passés ensemble, les différents congrès et les fou-rires dans le bureau. J'espère qu'on se retrouvera dans les années à venir dans les congrès cardiovasculaires…

A ma petite Malha !!! Tu as été d'un grand soutien pour moi. Tout d'abord, par ton rôle de pilier dans l'unité et je tenais à le dire. Merci pour ton investissement et ta rigueur dans la vie de laboratoire qui nous permettent de nous « faciliter bien des taches». Mais je tiens ici surtout à te remercier pour ton amitié, ton écoute et ta gentillesse. Nos conversations

confidences ces derniers mois ont été pour moi d'une aide immense dans la fin de ma thèse. Tu es une femme en or !

A Nicolas, un très grand merci pour ton investissement et ton soutien au cours mes années de thèse ! Cet article n'aurait pas été aussi abouti sans ton aide et je t'en suis reconnaissante… Merci pour toutes les discussions et les rigolades qu'on a pu avoir.

A mes co-thésardes… Alice, Mathilde P et Anaïs. Je suis très heureuse d'avoir partagé ces années thèse avec vous. Vous avez été d'un grand soutien pour moi dans les périodes plus difficiles et je vous en remercie beaucoup. Alice, ca y est !!! On y arrive enfin !!! Bon courage pour la suite, Anaïs et Mathilde. Je n'oublierai jamais nos petites séances papotages/pauses thé lors des périodes d'attente de nos manip.

A mes petits protégés de la team Notch ou Ragot's team… Mathilde B, Najla, Astrid, Sabine, Inès et Clément. J'espère ne pas vous avoir dégouté de la recherche lol. Merci pour votre aide et votre investissement au cours de mes différents protocoles : séances écho, pression, pose des mini-pompes, PCR et j'en passe... Vous n'étiez pas tous de grands amis de la souris (je ne citerai personne.. ;)), mais vous avez tous fait preuve de persévérance pour y arriver.

A l'équipe « Patrev », alias Patricia, Régine et Evelyne. Merci pour votre soutien et votre bienveillance, que ce soit lors des séances « baguage » des souris et des sacrifices avec Evelyne et Régine ou les discussions dans notre bureau avec Patricia. Merci également Karima et Christine pour votre aide et votre gentillesse malgré des commandes quelques fois à la dernière minute… Merci à vous toutes pour les moments passés au déjeuner.

A tous les autres stagiaires M1, M2 ou cliniciens venus d'ailleurs, et plus particulièrement Giuseppe et Mattia. Merci pour votre sens de l'humour et votre sympathie qui ont contribué à rendre la vie du labo si agréable.

Aux membres de l'équipe « Hugon » et notamment Sarah, Marion, Pascal et Sylvie. Merci pour votre gentillesse et pour les instants « café du matin ». Merci à Marion pour nous avoir fait découvrir Bordeaux le temps d'un weekend entre nana de la 942/965.

Je remercie également tous les membres de l'U965 et notamment mes alter-égos thésardes c'est-à-dire Rose, Marine, Diana et Gabrielle... Merci les filles pour votre gentillesse, et votre humour.

Résumé

Notch3, récepteur exprimé dans les cellules musculaires lisses (CML), est impliqué dans la maturation des artères de résistance. La délétion de *Notch3* aggrave les atteintes cardiaques induites par une hypertension artérielle (HTA), mais les mécanismes impliqués sont inconnus. Mes objectifs étaient de déterminer le rôle de la voie Notch3 dans le myocarde lors du remodelage cardiovasculaire induit par une surcharge de pression ou de débit. Nous avons étudié l'impact de l'absence de Notch3 lors l'HTA induite par l'Angiotensine II via deux modèles de souris (1- *Notch3 KO* et 2- invalidation induite de cette voie dans les CML, via *RBPJk*). Nous montrons que la voie Notch3-RBPJk est nécessaire à l'intégrité coronaire à l'âge adulte. Lors d'une HTA, son absence altère la réponse vasculaire et la microcirculation conduisant à un stress oxydant et une inflammation cardiaque. Puis, nous avons exploré les conséquences d'une surcharge de débit (exercice physique chez le mâle ou gestation chez la femelle *Notch3*$^{-/-}$). Les mâles *Notch3*$^{-/-}$ ne présentent pas de signes de réponse angiogénique après 5 semaines de course, mais ce protocole a un effet bénéfique sur l'hypertrophie cardiaque. En parallèle, l'analyse des cœurs femelles *Notch3*$^{-/-}$ montre un défaut artériolaire similaire aux mâles *Notch3*$^{-/-}$, mais sans hypertrophie ventriculaire. En post-partum, la densité capillaire augmente chez ces souris. Alors que le cœur post-partum se caractérise par un environnement anti-angiogénique, ces voies ne sont pas activées chez les femelles *Notch3*$^{-/-}$. Ces résultats démontrent que la voie Notch3 est nécessaire à la réponse adaptative du réseau coronaire en réponse à une surcharge de pression ou de débit.

Mots clés : Notch3, média coronaire, microcirculation, surcharge de pression, remodelage cardiaque, insuffisance cardiaque

Abstract

Notch3, a receptor expressed in the smooth muscle cells (SMC), is involved in the maturation of resistance arteries. *Notch3* knockout aggravates cardiac disorders induced by hypertension (HT), however mechanisms are unknown. My objectives were to determine the role of Notch3 signaling during cardiovascular remodeling induced by pressure or volume overload. First, we studied the Angiotensin II-induced HT consequences on two mouse models (1- congenital: *Notch3* KO or 2- induced invalidation of Notch signaling in SMC via *RBPJκ*). We showed that Notch3-RBPJκ signaling is required for the maintenance of coronary structure in the adult. During HT, Notch3 signaling defect impaired the media hypertrophic response and the microvasculation leading oxidative stress and inflammation. Then we aimed to define the consequences of volume overload (moderate exercise training in males or pregnancy in female *Notch3*$^{-/-}$ mice). The *Notch3*$^{-/-}$ males doesn't exhibit any signs of angiogenic responses in the microvascular compartment after 5 weeks of exercise training, however this protocol had positive effect on the basal hypertrophy. In parallel, female *Notch3*$^{-/-}$ mice exhibited the same arteriolar defect as males, without ventricular hypertrophy, suggesting a better adaptation. The post-partum hearts showed a microvascular adaptation in these mice. While cardiac status in post-partum is characterized by an anti-angiogenic environment leading to a physiological hypertrophy regression, these signaling pathways didn't seem to be active in the *Notch3*$^{-/-}$ mice. These results showed that Notch3 signaling pathway was necessary to the adaptive coronary network response to pressure or volume overload.

Key words: Notch3, coronary media, microcirculation, pressure overload, cardiac remodeling, heart failure

Abréviations

Ac : Anticorps

ACTA 2 : α-Actine de muscle lisse

ADHF : Acute Decompensatied Heart Failure

ADN : Acide DéoxiriboNucléique

Ang II : Angiotensine II

ARNm : Acides RiboNucléiques Messager

CADASIL : Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy

CD68 : Cluster of Différentiation 68

CMLV : Cellules musculaires Lisses Vasculaire

DHE : Dihydroéthidium

Dlll4 : Delta-like 4

eNOS : Endothelial NO synthase (ou NOS3)

EP : Entrainement physique

FR : Fraction de raccourcissement

FN-EDA : Ectodomaine A de la fibronectine cellulaire

Gal3 : Galectin-3

GAPDH : Glycéraldéhyde-3-Phosphate Déshydrogénase

HTA : Hypertension artérielle

HTAP : Hypertension artérielle pulmonaire

HES : Hairy and Enhancer of Split

HEY : Hairy and Enhancer of split with YRPW motif

IC : Insuffisance cardiaque

MEC : matrice extracellulaire

N3ICD : Notch3 intracellular Domain

PlGF : Placental Growth Factor

RBPJκ : Recombining binding protein suppressor of hairless

RT-PCR : Reverse transcription polymerase chain reaction

ROS : Reactive Oxyygen Species

sFLT1 : Soluble fms-like tyrosine kinase-1 (ou sVEGFR1)

VEGFA : Vascular Endothelial Growth Factor

VEGFR1 : Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1

VEGFR2 : Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2

VG : Ventricule gauche

WT : Wild-Type

Liste des tables et des figures

Figure 1 : Structures de la paroi de l'artère, de la veine et du capillaire 18

Table 1 : Expression des différents marqueurs de la cellule musculaire lisse vasculaire suivant le phénotype différencié/indifférencié. 22

Figure 2 : Voie de signalisation du VEGF 28

Figure 3 : Les différentes catégories de remodelage vasculaire 30

Figure 4 : Les principales voies de l'hypertrophie physiologique 36

Figure 5 : Mécanismes d'action responsables des hypertrophies ventriculaires concentriques ou excentriques 39

Figure 6 : Voies de signalisation du cardiomyocyte impliquées dans le remodelage hypertrophique pathologique 40

Figure 7 : Implication de l'inflammation médiée par les macrophages dans le remodelage pathologique cardiaque 43

Figure 8 : Structure des différents ligands de Notch suivant les espèces animales 45

Figure 9 : Structure des récepteurs Notch chez l'Homme 48

Figure 10 : La voie canonique des Notch 49

Table 2: Implication des mutations touchant les différents composants de la voie Notch dans les pathologies cardiovasculaires 51

Figure 11 : Croisement des souris femelles homozygotes RBPJ$\kappa^{loxp/loxp}$ avec des mâles SMMHC-CRE ER ^{T2} inductible par le tamoxifène. 65

Figure 12 : Implantation des mini-pompes osmotiques 67

Figure 13 : Protocole d'exercice physique sur tapis. 68

Table 3 : Amorces utilisées pour les PCR quantitatives 72

Table des matières

I. Introduction *13*

1. Le réseau vasculaire **16**

1.1. La circulation pulmonaire 16

1.2. La circulation systémique 16

1.3. Structure du système vasculaire 17

1.3.1. La paroi des vaisseaux 17

1.3.2. L'intima 18

1.3.3. La média 19

1.3.4. L'adventice 23

1.4. Les différents types d'artères 23

1.4.1. Les artères de conductance 23

1.4.2. Les artères de résistances 24

1.4.3. Le cas de la circulation coronaire 24

1.5. La microcirculation 26

1.5.1. La densité capillaire 26

1.5.2. L'angiogenèse 27

1.5.2.1. La voie du VEGF 27

1.5.2.2. Les autres voies de l'angiogenèse 29

1.6. Le remodelage vasculaire 30

1.6.1. Définition 30

1.6.2. Les différents types de remodelage 31

1.6.2.1. Remodelage externe hypertrophique 31

1.6.2.2. Remodelage interne hypertrophique ou eutrophique 31

1.6.2.3. Remodelage vasculaire et HTA 33

2. Le remodelage cardiaque **34**

2.1. Hypertrophie cardiaque, un phénomène compensatoire 34

2.2. L'hypertrophie physiologique 34

2.2.1. Principaux mécanismes moléculaire de l'hypertrophie physiologique du cardiomyocyte 35

2.2.2. Autres déterminants l'hypertrophie physiologique 37

2.3. L'hypertrophie pathologique 38

2.3.1. Hypertrophie concentrique versus hypertrophie excentrique 38
2.3.2. Les intervenants de l'hypertrophie cardiaque pathologique 40
2.3.2.1. Principaux mécanismes moléculaires de l'hypertrophie pathologiques du cardiomyocyte 40
2.3.2.2. La fibrose 41
2.3.2.3. L'inflammation et le stress oxydant 42
3. La voie de signalisation Notch 44
3.1. Généralités 44
3.1.1. Les ligands 44
3.1.2. Les effecteurs 45
3.1.3. Les récepteurs 47
3.1.4. La cascade de signalisation de Notch 48
3.2. Rôle de la voie Notch dans le système cardiovasculaire 50
3.2.1. Notch et le développement cardiovasculaire 50
3.2.2. Notch et le cœur au stade post-natal 51
3.2.3. Notch et le système vasculaire 52
3.3. Notch3, rôles physiologiques et pathologiques 53
3.3.1. Rôle de Notch3 dans la physiologie des CMLV 54
3.3.1.1. Notch3 et le phénotype des CMLV 54
3.3.1.2. Notch3 et la prolifération, migration et survie des CMLV 56
3.3.2. Implication de Notch3 en pathologie humaine 57
3.3.2.1. Notch3 et CADASIL 57
3.3.2.2. Notch3 et hypertension artérielle pulmonaire 61
4. Objectifs 62
II. Matériels&Méthodes 63
1. Modèles animaux 64
1.1. Souris Notch3 KO (*Notch3*$^{-/-}$) 64
1.2. Oligonucléotides antisens Notch3 64
1.3. Souris avec invalidation inductible de RBPJκ dans les CML 65
1.4. Souris reportrices de l'activité recombinase de la CRE dans les CMLV 66
2. Modèles d'hypertrophie cardiaque 66
2.1. Hypertension artérielle par infusion d'Angiotensine II 66
2.2. Surcharge de débit induite par un entraînement physique 67
2.3. Surcharge de débit induite par la gestation 68

3. Evaluations fonctionnelles 69

3.1. Mesure de la pression artérielle 69

3.2. Echocardiographie 69

4. Mise à mort des souris et prélèvement des organes 70

5. Analyses quantitatives et qualitatives 70

5.1. Extraction des ARN totaux et réverse transcription 70

5.2. RT-PCR quantitatives 71

6. Histologie 73

6.1. Marquages fluorescents 73

6.2. Estimation de la fibrose par coloration au rouge Sirius 74

6.3. Localisation de l'activité de la CRE par marquage à la ß-Galactosidase et coloration hématoxyline-éosine 75

7. Quantification protéique par western blot 75

7.1. Extractions protéiques 75

7.2. Western Blot 76

8. Analyses statistiques 77

III. Résultats 78

1. Chapitre 1: L'invalidation de la voie Notch3 dans les CMLV favorise l'insuffisance cardiaque en réponse à l'HTA 79

1.1. Introduction 80

1.2. Résultats et discussion 81

1.2.1. L'invalidation de la voie de Notch3 dans les CML induit une insuffisance cardiaque en réponse à l'HTA 81

1.2.2. L'invalidation de la voie de Notch3 dans les CML altère l'adaptation de la macro et de la microcirculation à l'HTA. 82

1.2.3. L'invalidation de la voie de Notch3 dans les CML conduit à un remodelage cardiaque délétère induit par l'HTA 83

1.2.4. La décompensation cardiaque secondaire l'invalidation de la voie Notch3 est associée avec une altération des voies angiogéniques. 83

1.3. Conclusions 84

1.4. Article original 85

***2.* Chapitre 2 : Effet de l'invalidation de *Notch3* sur le remodelage cardiovasculaire induit par une surcharge de débit 108**

2.1. Introduction 109

2.2. Résultats et discussion 111

2.2.1. Paramètres physiologiques des mâles et femelles *Notch3*$^{-/-}$ 111

2.2.2. Comparaison du phénotype cardiaque des souris femelles *Notch3*$^{-/-}$ par rapport aux mâles…...……..112

2.2.3. Phénotype cardiaque des souris après une surcharge de débit 114

2.2.3.1. Explorations fonctionnelles..... 114

2.2.3.2. Production de ROS cardiaques..... 117

2.2.3.3. Analyses du compartiment microvasculaire..... 119

2.2.3.4. Analyses du compartiment microvasculaire..... 121

2.3. Conclusions..... 124

IV. Discussion 126

1. La voie de signalisation de Notch3 sur le système vasculaire..... 127
2. L'absence de la voie Notch3 impacte le cœur adulte 130
3. Notch3, implications respectives dans l'HTA et l'HTAP 131
4. Cœur *Notch3*$^{-/-}$ et réadaptation à l'effort ?..... 137
5. Notch3, effet cardiaque différentiel selon le genre?..... 138
6. Et au le plan clinique ? 141

V. Bibliographie 143

I. Introduction

Pour assurer ses fonctions et sa survie, chaque cellule de l'organisme a besoin d'un apport continu en oxygène et en nutriments. Cet apport est assuré par le système cardiovasculaire constitué d'une double pompe, le cœur (droit et gauche) ; d'un fluide, le sang; ainsi que d'un réseau de conduction fermé, les vaisseaux sanguins. Le système cardiovasculaire permet également l'élimination des métabolites vers les poumons et les reins (dioxyde carbone, urée, créatinine), la transmission des réponses hormonales, la régulation de la température corporelle et la défense immunitaire via le transport des anticorps et des cellules immunitaires (lymphocytes, monocytes…) à travers les vaisseaux.

Le système vasculaire se compose de deux circuits de transport distincts en série : la circulation pulmonaire et la circulation systémique, auquelle s'ajoute la circulation lymphatique. La circulation pulmonaire, assurée par le cœur droit, permet l'oxygénation du sang au niveau des alvéoles pulmonaires, alors que la circulation systémique, assurée par le cœur gauche, distribue les nutriments et l'oxygène aux différents organes, au premier rang desquels figurent le cœur lui-même mais aussi le cerveau, le foie et les reins.

Au cours de la vie, le système cardiovasculaire peut subir des changements hémodynamiques, que ce soit pour des causes physiologiques (entraînement physique ou grossesse chez la femme) ou pathologique dans le cas d'une hypertension artérielle (HTA). Lorsque ces modifications hémodynamiques deviennent chroniques, le système cardiovasculaire, y compris le myocarde, subit un remodelage afin de s'adapter et d'assurer le maintien de sa fonction c'est à dire une perfusion adéquate des tissus sur les différents organes. Bien que ce remodelage soit bénéfique à l'origine, il peut conduire à une insuffisance cardiaque à long terme. Les mécanismes impliqués dans le remodelage cardiovasculaire ont été beaucoup étudiés ces dernières années, mais certains points, notamment au niveau des cellules musculaires lisses, restent encore à être éclaircis.

Nous nous sommes intéressés ici à l'implication de la voie Notch3. Des études ont montré que la protéine Notch3 avait un rôle clé dans la physiologie des petites artères de résistance en contrôlant la maturation des CMLV (Domenga et al. 2004) (Domenga, Fardoux et al. 2004) et le tonus myogénique (Belin de Chantemele et al. 2008). Notch3 a été montré impliqué dans diverses pathologies humaines telles que CADASIL (Joutel et al. 1996), une démence vasculaire, ou l'hypertension artérielle pulmonaire où il aurait un rôle délétère en favorisant la prolifération des CMLV (Li et al. 2009).

Une précédente étude menée par l'équipe de Christos Chatziantoniou a montré qu'une invalidation du récepteur Notch3 aggravait les altérations rénales et cardiaques induites par une HTA (Boulos et al. 2011). En effet, des souris invalidées pour *Notch3* soumises à une perfusion continue d'Angiotensine II (Ang II) mouraient prématurément avec un tableau d'anasarque et des signes d'insuffisance cardiaque. Cependant, les mécanismes mis en jeu n'étaient pas connus.

Mon projet de recherche visait à mieux comprendre le rôle de la voie Notch3 dans le système coronaire adulte et à définir l'implication de la voie de signalisation de Notch3 dans le remodelage cardiaque induit par une surcharge de pression ou une surcharge de débit. Pour mener à bien ces objectifs, l'approche expérimentale a reposé sur l'étude de modèles génétiques conduisant à la répression de la voie *Notch3* permanente ou induite chez des souris soumises ou non à une HTA, un entraînement physique modéré ou une première grossesse.

1. Le réseau vasculaire

1.1. La circulation pulmonaire

La circulation pulmonaire est un système à basse pression (14 mm Hg en moyenne), à faible résistance, mais à haut débit. En effet, le poumon est le seul organe à recevoir l'intégralité du débit cardiaque. Ces caractéristiques sont liées à 2 propriétés particulières à cette circulation : 1- une grande capacité à recruter des vaisseaux pour faire face à une augmentation de flux sanguin 2- une compliance des artérioles pré-capillaires liée à une paroi composée d'un endothélium recouvrant une seule couche de CMLV, alors que la paroi des vaisseaux systémiques est plus épaisse et très riche en cellules musculaires donc moins compliante. La circulation pulmonaire se distingue également par sa réponse au stress hypoxique. En effet, la diminution de l'oxygène au niveau alvéolaire entraine une vasoconstriction des vaisseaux adjacents permettant une redistribution du flux sanguin, alors que l'hypoxie est responsable d'une vasodilatation dans les autres organes.

1.2. La circulation systémique

La circulation systémique prend naissance au niveau du ventricule gauche pour aboutir à l'oreillette droite. Elle fournit à l'ensemble des tissus de l'organisme les éléments nécessaires à leur bon fonctionnement et assure l'élimination des déchets métaboliques.

Contrairement à la circulation pulmonaire, la circulation systémique est un système à haute pression (100mm Hg en moyenne) qui perfuse les autres organes de l'organisme à des

débits différents. Ce maintien de la pression au niveau du réseau artériel se fait grâce aux résistances opposées par tous les vaisseaux périphériques et notamment au niveau des artérioles, principaux vaisseaux résistifs.

Dans la circulation systémique, comme la circulation pulmonaire, le contrôle du tonus myogénique vasculaire est indispensable dans les phénomènes d'adaptation aux modifications de débit ou de pression. Le tonus vasculaire et son contrôle sont directement liés à la structure des vaisseaux sanguins.

1.3. Structure du système vasculaire

1.3.1. La paroi des vaisseaux

La paroi des artères et des veines, à l'exception des plus petites, est composée de trois tuniques distinctes qui entourent un espace central rempli de sang, la lumière : l'intima, la média et l'adventice (de l'intérieur vers l'extérieur du vaisseau) (Figure 1).

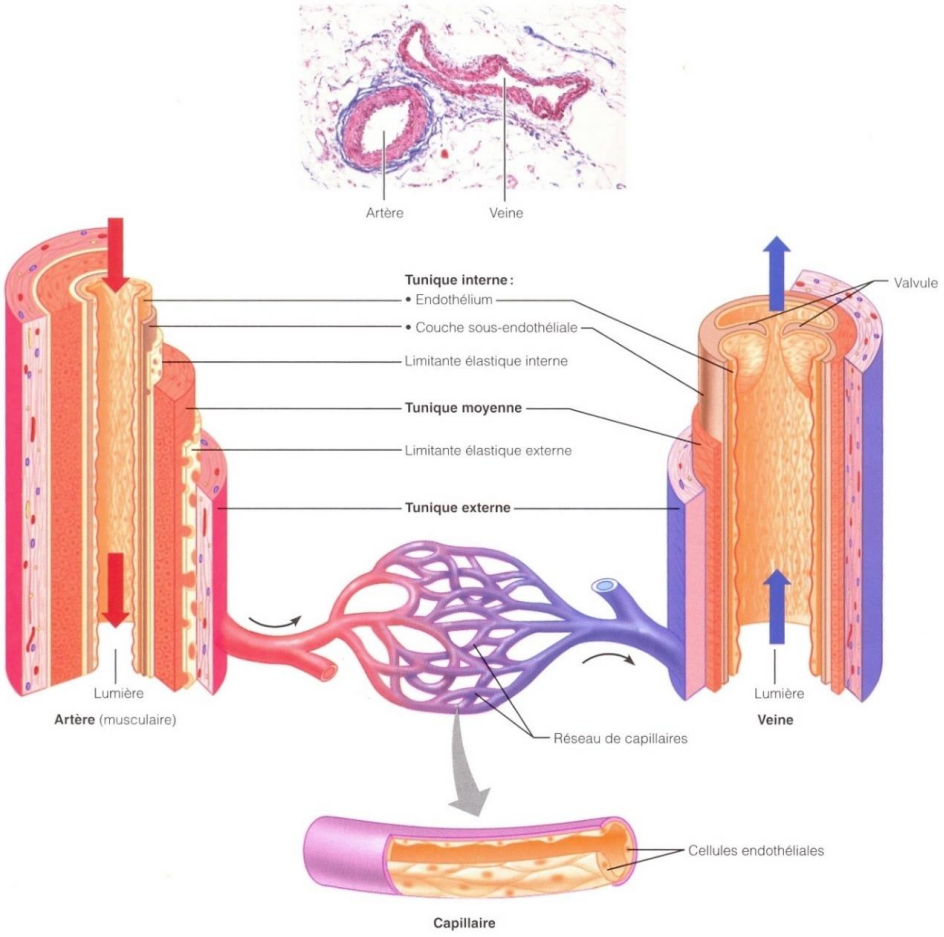


Figure 1 : Structures de la paroi de l'artère, de la veine et du capillaire

1.3.2. L'intima

Au contact direct avec le sang, la tunique interne, ou intima, du vaisseau sanguin est constituée d'un endothélium reposant sur une couche sous-endothéliale et est délimitée de la média par la limitante élastique interne.

L'endothélium est constitué d'une monocouche de cellules endothéliales pavimenteuses (0,1-1 µm d'épaisseur). Leur orientation en parallèle du vaisseau est la conséquence des forces de cisaillement appliquées à leur surface par le flux sanguin (Levesque and Nerem 1985). La surface de ces cellules est recouverte de glycocalyx, une

couche de glyocaminoglycanes chargées négativement, qui joue un rôle dans l'inhibition de la thrombose sur la surface endothéliale et dans la régulation des grosses molécules dont les lipoprotéines et les protéines plasmatiques. Les cellules endothéliales sont jointives via des jonctions de types serrées ou desmosomes (Movat and Fernando 1963) (Schwartz and Benditt 1972). L'endothélium dans les vaisseaux cérébraux présentent ainsi des cellules endothéliales hautement jointives limitant les échanges dans la barrière hématoencéphalique, alors que certains capillaires (capillaires sinusoïdes) sont constitués de cellules endothéliales disposées de manière discontinue et fenêtrée. Outre sa fonction de barrière physique entre le sang et les tissus, l'endothélium module le tonus et la vasomotricité des CMLV sous-jacentes via la sécrétion de médiateurs vasoconstricteurs tels que l'endothéline (Yanagisawa et al. 1988), l'enzyme de conversion de l'angiotensine qui produit l'angiotensine II (Carmines et al. 1986) ou le thromboxane A2 (Taddei and Vanhoutte 1993) ; mais aussi des molécules vasorelaxantes comme la prostacycline (Shimokawa et al. 1988), le facteur hyperpolarisant ou le monoxyde d'azote (NO) (Ignarro 1989).

L'endothélium repose sur la lame basale constituée de collagène (principalement de type IV) et de glycoprotéines qui servent de support lors de la régénération de l'endothélium. L'intima est enfin délimitée par une limitante élastique interne composée de fibres élastiques transversales.

1.3.3. La média

La tunique moyenne, ou média, comprend principalement des cellules musculaires lisses organisées de manière concentrique autour de l'axe luminal du vaisseau, ainsi que de feuillets d'élastine continus (aorte) ou non (artère de résistance) formant des unités lamellaires. Chaque unité lamellaire est constituée de CMLV entourées d'une matrice

extracellulaire (MEC) composée de microfibrilles de collagène, d'élastine et de glycosaminoglycanes (Wolinsky and Glagov 1967). Leur nombre augmente suivant le diamètre du vaisseau sanguin. L'activité contractile du muscle lisse vasculaire est contrôlée par le système nerveux sympathique et par les médiateurs vasoactifs. La média a un rôle clé dans la régulation de la circulation. En effet, de mineures variations du diamètre des vaisseaux ont des effets marqués sur la pression et le débit sanguins.

Les cellules musculaires lisses. Les CMLV sont les seules cellules de la média. De forme généralement fusiforme, ces cellules sont mononucléées et mesurent de 2 à 5 µm de diamètre pour une longueur allant jusqu'à 500 µm. Les CMLV sont continuellement soumises à des signaux mécaniques ou biochimiques du fait de la pulsatilité de la circulation sanguine. Elles transforment cette stimulation mécanique en signaux intracellulaires via des processus de mécanotransduction impliquant des protéines intégrines, des récepteurs à activité tyrosine kinase et/ou des canaux ioniques (Haga et al. 2007). Ces multiples voies de signalisation lui permettent de répondre en se contractant ou se relaxant. Les CMLV synthétisent et sécrètent également les constituants de la matrice extracellulaire environnante et participent à la réparation vasculaire en cas de lésions.

Les CMLV ont la capacité de modifier leur phénotype pour répondre aux modifications environnementales. Elles peuvent évoluer d'un phénotype différencié dit « contractile » vers un d'un phénotype dédifférencié dit « sécrétoire ». Chacun de ces phénotypes se caractérise par un profil protéique spécifique (voir Table 2). Le phénotype sécrétoire, qui est aussi dit immature, est observé dans les vaisseaux de l'embryon, mais aussi dans certaines pathologies vasculaires telles que l'athérosclérose et l'HTA. Ces cellules ont la capacité de proliférer, de migrer et de sécréter une quantité plus importante de MEC. Le phénotype contractile, observé dans les vaisseaux sains de l'adulte, se caractérise par la présence de protéines contractiles et une faible capacité de croissance.

Le processus de mécanotransduction, via les intégrines, modifie le phénotype des CMLV et leurs fonctions en modulant ainsi la différenciation, la prolifération, la survie, la migration et l'organisation de la MEC (Shyy and Chien 2002). En réponse à un stress mécanique, l'expression rapide et transitoire de molécules régulatrices est induite telle que des facteurs de transcription (c-Fos, Sp1, Egr1), des molécules de signalisation (JNK, P38, ERK), des facteurs de croissance (FGF-2, PDGF) et des protéines contractiles (Caldesmone, SM-MHC) (Chapman et al. 2000 ; Cheng et al. 2007 ; Albinson et Hellstrand 2007 ; Qu et al. 2007). D'autres facteurs influencent également la différenciation des CMLV tels que l'interaction avec les cellules endothéliales, l'endocytose de molécules ou des facteurs de croissance. Ainsi, les voies Notch et Wnt, si elles sont activées, peuvent contrôler le phénotype des CMLV en modulant l'expression génique des protéines contractiles. Les facteurs, comme Platelet-derived growth factor-BB (PDGF-BB) et Transforming growth factor-β (TGF-β), conduisent également à une transition phénotypique des CMLV (Tang et al. 2011). Alors que le PDGF-BB réprime l'expression des gènes contractiles des CMLV, le TGF-β exerce le rôle inverse. Par ailleurs, *in vitro* il est montré des interactions entre ces voies de signalisation. La voie Notch interagit avec les voies du PDGF-BB (Jin et al. 2008) et du TGF-β (Tsaousi et al. 2011) (Kurpinski et al. 2010) pour moduler la migration et la différenciation des CMLV via l'activation de kinases telles que : Extracellular signal-Regulated Kinase (ERK), c-Jun-N-terminal Kinase (JNK), p38 Mitogen-Activated Protein Kinase, RAC-alpha Serine/Threonin-protein (AKT), Rho/Rho-kinase, and calcineurin/calmodulin kinase.

Table 1 : Expression des différents marqueurs de la cellule musculaire lisse vasculaire suivant le phénotype différencié/indifférencié. (D'après Couffhinal et al, « la différenciation de la CML dans la pathologie vasculaire »)

	CML dédifférenciée/immature (média embryonnaire, culture, lésion vasculaire, hypertension)	**CML mature (média adulte,)**
Protéines contractiles et du cytosquelette		
β-Non Muscle Actin	+ + +	±
α-Smooth Muscle Actin	±	+ + +
γ-Smooth Muscle Actin	±	+ + +
Caldesmone 70 kD	+ + +	±
Caldesmone 150 kD	±	+ + +
Calponine	±	+ + +
α-Tropomyosine	±	+ + +
Meta Vinculine	±	+ + +
SM2	±	+ + +
SM Myosin Heavy Chain SM-1, SM-2	±	+ + +
Non Muscle Myosin Heavy Chain	+ + +	±
Vimentine	+ + +	+ + +
Desmine	±	+ + +
Intégrines		
α1β1, α3β1	±	+ + +
α4β1, α5β1	+ + +	±
Molécules d'adhésion		
ICAM-1, VCAM-1	+ + +	±
Matrice extra-cellulaire		
Fibronectine (ED-A, ED-B)	+ + +	±
Laminine	±	+ + +
Ténascine	+ + +	±
Tropoélastine	+ + +	±
Ostéopontine	+ + +	±
α1-Procollagène	+ + +	±

1.3.4. L’adventice

La tunique externe, aussi appelée externa ou adventice, est riche en fibroblastes. Elle est principalement composée de fibres collagènes lâchement entrelacées qui protègent et renforcent les vaisseaux afin de permettre l’ancrage aux structures environnantes. L’adventice est parcourue de neurofibres et de vaisseaux lymphatiques, ainsi que de fibres élastiques dans les grandes veines. Dans les gros vaisseaux, elle est parcourue par de minuscules vaisseaux sanguins, nommés vaso vasorom (« vaisseaux des vaisseaux »), qui nourrissent les parties externes de la media, alors que la partie interne est nourrie directement par le sang qui s’écoule dans la lumière.

1.4. Les différents types d’artères

1.4.1. Les artères de conductance

Les artères de conductance constituent les gros troncs du système circulatoire. Elles assurent l’amortissement de la pulsatilité du flux à l’éjection du cœur et une fonction de conduction du sang vers les organes cible. La média est constituée de lames élastiques qui leur confèrent une compliance. Les artères de conductance transforment cette pression pulsatile au niveau de l’aorte en une pression continue au niveau artériolaire, ce qui permet la réduction des dépenses énergétiques de la perfusion des organes cibles.

1.4.2. Les artères de résistances

En aval des artères de conductance, le système circulatoire se ramifie en artères de plus petits calibres ou artères de résistance, de diamètre de 300 à 100 µm (Mulvany and Aalkjaer 1990). Contrairement aux artères de conductance, les artères de résistance possèdent peu de fibres élastiques, mais un grand nombre de CMLV qui leur permettent d'adapter le diamètre de l'artère aux conditions environnementales. Elles régulent la distribution du sang vers les différents organes et interviennent dans de nombreuses pathologies. Comme leur nom l'indique, les artères de résistance assurent le contrôle du débit sanguin via leur capacité de résistance. Plusieurs facteurs participent au contrôle du débit sanguin (Bohlen 1986). L'activité métabolique (PO2, PCO2, pH, monoxyde d'azote, endothéline-1…) exerce une action directe sur le tonus vasculaire (Kittle et al. 1965; Ignarro et al. 1987; Broten and Feigl 1992). Les facteurs mécaniques entrainent des réponses variées. En effet, la pression induit une contraction des CMLV et augmentent ainsi le tonus myogénique. A l'inverse, le débit génère des forces de cisaillement aboutissant à une vasodilatation via la libération de molécules relaxantes par les cellules endothéliales. Le tonus myogénique et la dilatation débit-dépendante déterminent un tonus de base donnant aux artères de résistance la capacité de se dilater ou de se contracter selon les besoins métaboliques. Enfin, la régulation entre les différents territoires vasculaires est contrôlée par l'innervation principalement sympathique.

1.4.3. Le cas de la circulation coronaire

La circulation coronaire diffère des autres circulations dans la mesure où elle irrigue un organe en perpétuelle activité. L'activité contractile du cœur interfère avec sa perfusion du fait d'une compression des artères coronaires en systole, ce qui limite fortement le flux sanguin durant cette phase. Pour palier à cette contrainte, l'extraction de l'oxygène par le

myocarde est presque maximale au repos. Ainsi, lorsqu'une demande en oxygène augmente, par exemple lors d'un exercice physique ou d'un stress, le cœur a comme seul moyen d'augmenter le débit coronaire pour répondre à ses besoins. La circulation coronaire possède ainsi un système d'autorégulation capable d'adapter les apports aux besoins en oxygène du cœur (Johnson 1986; Dole 1987).

Cette autorégulation intrinsèque permet au cœur de normaliser très rapidement son débit lorsque la pression de perfusion varie pour une demande en oxygène constante. L'autorégulation est indépendante des systèmes nerveux et humoraux. Il fait intervenir le contrôle du tonus myogénique des vaisseaux de résistance via la production endothéliale de NO. En présence d'une sténose sévère, les capacités d'autorégulation sont limitées et la perfusion du myocarde est rapidement compromise. Il en résulte une ischémie pouvant conduire à un infarctus, d'autant plus que les vaisseaux collatéraux ne participent pas à l'autorégulation.

La « réserve coronaire » repose sur ce processus d'autorégulation, puisqu'elle définit la capacité maximale du débit coronaire à s'élever au-dessus de la valeur de base à travail et pression constants. Elle représente le rapport entre la valeur maximale du débit coronaire mesurée après injection d'un vasodilatateur artériolaire (adénosine par exemple) et le débit coronaire basal. Elle témoigne ainsi de l'intégrité de la circulation artériolaire et capillaire. Une baisse de la réserve coronaire traduit un déséquilibre du rapport apport/demande en oxygène qui peut être dû à une réduction du débit coronaire maximal (sténose, élévation des pressions intracardiaques, HTA…) ou une augmentation du débit coronaire de base (hypertrophie ventriculaire gauche, anémie…) (Artigou et al. 2007).

1.5. La microcirculation

La microcirculation peut être subdivisée en deux compartiments:

- les artérioles, principales responsables du gradient de pression artérioveineux (Pries et al. 1995), interviennent dans la régulation de la pression artérielle. Elles ont un rôle clé dans la régulation de la perfusion tissulaire ;
- les capillaires assurent l'apport de l'oxygène aux cellules. L'efficacité de cette distribution dépend de l'anatomie du réseau capillaire et de l'efficacité des régulations artériolaires des débits capillaires.

1.5.1. La densité capillaire

La densité capillaire est l'un des paramètres fondamentaux de l'oxygénation tissulaire, car elle détermine la proportion de tissu oxygéné. On distingue la densité capillaire, dite « structurale ou anatomique», qui reflète la structure morphologique du réseau pour chaque organe et la densité capillaire, dite « fonctionnelle », reflétant le nombre de capillaires effectivement perfusés à un instant donné.

La densité capillaire anatomique peut varier au long terme (accroissement lors de l'entraînement physique ou raréfaction induite par l'HTA…) sous l'influence de facteurs pro- ou anti-angiogéniques. A l'opposé, la densité capillaire fonctionnelle peut être modifiée très rapidement. En effet, elle peut augmenter de plus de 100% pour répondre à une demande métabolique accrue, dans le cas d'un exercice physique par exemple. C'est ce recrutement capillaire anatomique ou fonctionnel qui est l'un des paramètres majeurs de l'adéquation de l'apport d'oxygène/ besoins métaboliques.

1.5.2. L'angiogenèse

L'angiogenèse se définit comme la formation de nouveaux vaisseaux à partir de vaisseaux préexistants (Risau 1997). Ce processus est initié par l'activation des cellules endothéliales qui prolifèrent formant de nouveaux tubes. Par la suite, le recrutement de péricytes (pour les capillaires et les petits vaisseaux) et de CMLV (pour les vaisseaux de plus gros calibre) permet d'assurer la stabilité et la perfusion de ces néo-vaisseaux. Dans ce processus, le niveau d'oxygène joue un rôle majeur puisque l'hypoxie est un puissant activateur de l'angiogenèse notamment via l'activation de la protéine HIF-1α (hypoxia inducible factor α). Alors que la vasculogenèse est très active durant le développement embryonnaire, l'angiogenèse peut se poursuivre, dans une moindre mesure, après la naissance dans un contexte physiologique (croissance, exercice physique, grossesse), mais aussi pathologique (hypoxie, cancer). En pathologie cardiovasculaire, il a été établi qu'un déficit en angiogenèse contribuait au développement d'insuffisance cardiaque (Walsh and Shiojima 2007).

1.5.2.1. La voie du VEGF

L'angiogenèse est contrôlée par différents facteurs de croissance qui sont libérés dans les tissus entourant les petits vaisseaux impliqués. Parmi ces facteurs, le VEGF (Vascular Endothlelial Growth Factor) joue un rôle prépondérant (Folkman et al. 1971; Leung et al. 1989; Plouet et al. 1989). La famille du VEGF comprend 5 membres: les VEGF-A, B, C, D et le PlGF (Placental Growth Factor) dont le plus étudié est le VEGFA (Ferrara et al. 2003) (Figure 2).

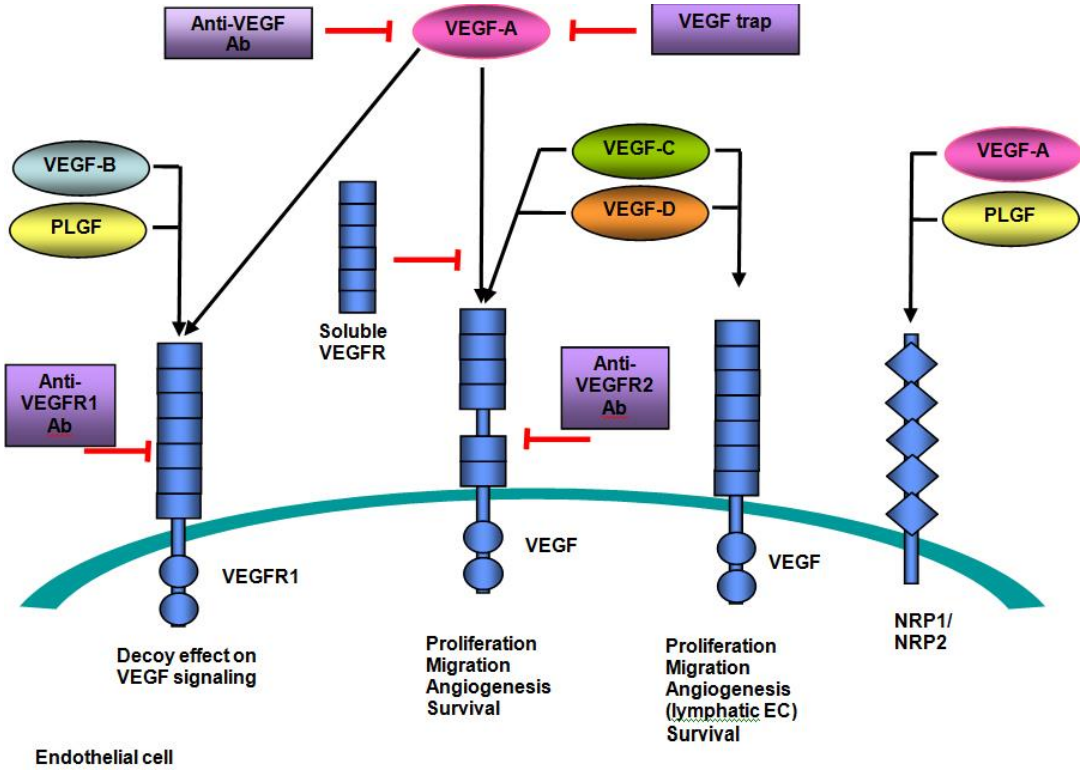


Figure 2 : Voie de signalisation du VEGF (N. Shonka, and M. Gilbert.)

Il s'agit d'une glycoprotéine homodimérique de 45 kDa dont l'expression est contrôlée par HIF-1α. Tous les membres de la famille du VEGF agissent par l'intermédiaire de récepteurs à un segment transmembranaire à activité tyrosine-kinase. A ce jour, 3 récepteurs ont été caractérisés : le VEGFR1/FLT1 (fms related tyrosine kinase 1) et sa forme soluble sVEGFR1/sFlt1, VEGFR2/FLK1 (fetal liver kinase-1) et VEGFR3/FLT4. Ils présentent une expression et une fonction distinctes. Alors que VEGFR1 et VEGFR2 sont exprimés dans l'endothélium, VEGFR3 est restreint aux vaisseaux lymphatiques. Par ailleurs, le VEGFA se lie préférentiellement aux VEGFR1 et VEGFR2 (Ferrara, Gerber et al. 2003; Takahashi and Mai 2005). La délétion de *VEGFR1* chez la souris est létale au stade embryonnaire du fait d'une croissance accrue des cellules endothéliales et d'une désorganisation des vaisseaux sanguins. Ces données suggèrent un rôle inhibiteur de ce récepteur lors de la vasculogenèse

(Fong et al. 1995). Malgré sa forte affinité pour le VEGFA (x10 fois versus VEGFR2), VEGFR1 a une faible activité de transmission des signaux et aurait un rôle limité dans les cellules endothéliales (Sun et al. 2001). VEGFR1 pourrait piéger le VEGFA inhibant ainsi l'activation de son homologue VEGFR2 par le VEGFA. En revanche, il stimulerait l'angiogenèse médiée par le PlGF (Assy et al. 1999) (Shibuya et al. 1999). Issue d'un épissage alternatif, la forme soluble sVEGFR1/sFLT lierait le VEGFA et le PlGF circulants diminuant ainsi leurs activités (Kendall et al. 1996).

A l'inverse, le VEGFR2 est le principal récepteur médiateur de l'activité du VEGFA. La délétion du gène *VEGFR2* chez la souris est létale par des défauts de vascularisation (Shalaby et al. 1995). VEGFR2 est impliqué dans la croissance, la survie et la migration des cellules endothéliales durant la vie embryonnaire et la vie adulte (Shibuya and Claesson-Welsh 2006). L'activation de cette voie participerait également à la perméabilité vasculaire induite par le VEGFA.

1.5.2.2. Les autres voies de l'angiogenèse

D'autres facteurs sont impliqués dans l'angiogenèse tels que le FGF-2 (Fibroblast Growth Factor 2), un agent mitogène des cellules endothéliales, des CMLV et des fibroblastes. Il favoriserait la formation d'un réseau capillaire *in vitro* par les cellules endothéliales en présence du VEGFR1 (Kanda et al. 2004) suggérant une interaction entre ces deux voies. Par ailleurs, le PDGF et le TGF-β permettent le recrutement de péricytes et favorisent ainsi la maturation et la stabilisation du capillaire nouvellement formé (Sato et al. 1990; Betsholtz 2004). L'angiogenèse physiologique dépend de l'équilibre complexe entre des facteurs angiogéniques (le VEGF, FGF2, TGF-β et les angiopoïétines) et des facteurs anti-angiogéniques (angiostatine, endostatine, thrombospondines).

1.6. Le remodelage vasculaire

1.6.1. Définition

Le remodelage vasculaire est un processus adaptatif caractérisé par des modifications morphologiques de la paroi vasculaire (changement de diamètre ou d'épaisseur) au cours de processus physiologiques et pathologiques. Il implique la production et/ou la dégradation de la matrice extracellulaire, la prolifération, la migration et la mort cellulaire (Gibbons and Dzau 1994). Le remodelage vasculaire est stimulé par des facteurs locaux tels que les peptides vasoactifs et le stress oxydant. Il peut être externe hypertrophique (grosses artères) et interne eutrophique ou hypertrophique (les petites artères de résistance) (Figure 3).

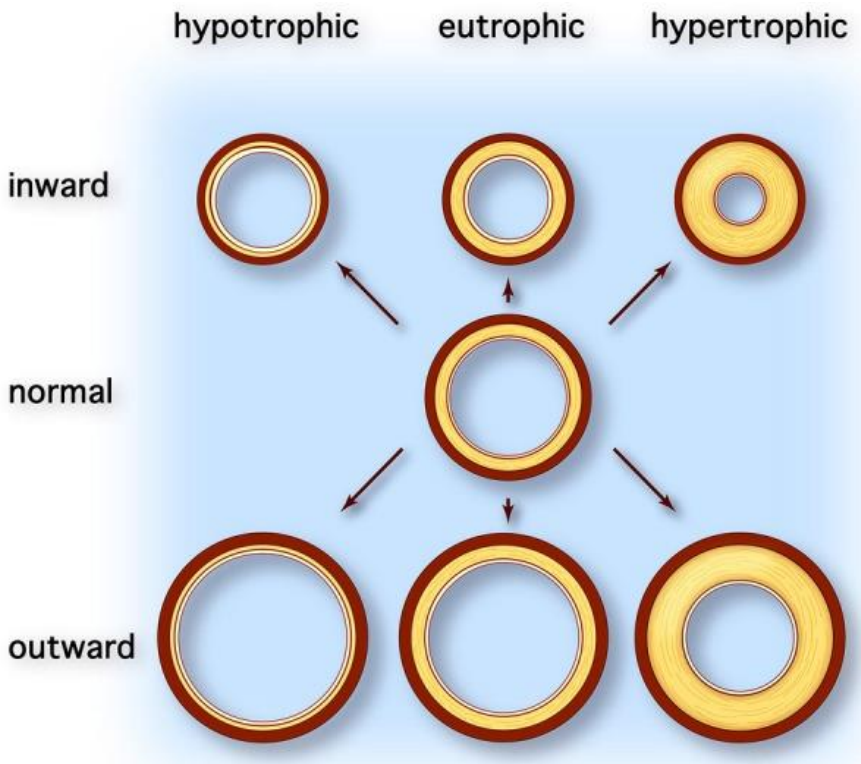


Figure 3 : Les différentes catégories de remodelage vasculaire. Six modèles sont proposés par Mulvany et al. (Mulvany et al. 1996)

1.6.2. Les différents types de remodelage

1.6.2.1. Remodelage externe hypertrophique

Le remodelage vasculaire externe, ou « outward », est caractérisé par l'augmentation du diamètre de la lumière et des modifications des protéines de la matrice extra-cellulaire (MEC). Ces modifications sont la conséquence de l'activation de la NO synthase endothéliale (eNOS) et de la matrice métalloprotéinase-9 (MMP-9), mais aussi de l'hypertrophie de la média (Schiffrin 2004; Dumont et al. 2007). Ce remodelage peut être physiologique en réponse à une surcharge de débit (induction lors de croissance, de la grossesse ou un exercice physique) (Mandala and Osol 2012; Vessieres et al. 2012), mais aussi pathologique (surcharge de volume (fistule artérioveineuse) ou encore anévrysme artériel). Lors d'un exercice physique par exemple, la demande métabolique tissulaire augmente. La libération locale de vasodilateurs augmente le diamètre artériolaire, ce qui réduit les résistances périphériques et augmente le débit sanguin. La libération d'agents vasodilatateurs dérivés de l'endothélium tels que le NO, les prostacyclines, la bradykinine ou le facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium (EDHF), est induite par l'augmentation des contraintes de cisaillement secondaire à l'élévation du débit (Hilgers et al. 2003) (Huang et al. 2001). L'augmentation de la pression transpariétale, secondaire à la dilatation, active l'expression d'oncogènes, la production de facteurs de croissance et donc l'hypertrophie/hyperplasie des CMLV de la média (Berk 2001).

1.6.2.2. Remodelage interne hypertrophique ou eutrophique

A l'inverse, le remodelage vasculaire interne, induit lors d'une HTA notamment, est défini par une diminution du diamètre luminal. Cette réduction de la lumière peut résulter d'un épaississement pariétal (hypertrophie) ou d'un réarrangement des cellules murales (eutrophique). L'épaississement de la média est associé à la prolifération et/ou l'hypertrophie

des CMLV, ainsi qu'une synthèse accrue de la MEC (Touyz et al. 2001). Les vaisseaux, présentant un remodelage vasculaire eutrophique, sont caractérisés par une diminution du diamètre luminal et une augmentation du rapport média/lumière sans augmentation du nombre de cellules (Schiffrin 2004). Ce remodelage varie selon le lit vasculaire : l'hyperplasie des CMLV est prédominante dans les petites artères de rats hypertendus, alors que l'hypertrophie se retrouve dans les artères de plus gros calibre (Lee et al. 1983; Mulvany et al. 1985). Chez le rat hypertendu, le remodelage eutrophique est associé à l'activation du système rénine-angiotensine-aldostérone (Brassard et al. 2005), alors que la voie endothéline induit un remodelage hypertrophique (Schiffrin 2001). Les mécanismes impliqués dans le remodelage interne eutrophique sont encore peu connus. Cependant, une croissance interne accompagnée d'une apoptose périphérique, ou une vasoconstriction associée à une expansion de la MEC (Bakker et al. 2002) sont parmi les hypothèses.

L'inflammation a également été montrée comme un élément conduisant au remodelage vasculaire (Intengan and Schiffrin 2001) via l'infiltration de cellules inflammatoires, la surexpression de médiateurs inflammatoires tels que Vascular Cellular Adhesion Molecule 1 (VCAM1), Intercellular Adhesion Molecule 1 (ICAM1), Nuclear Factor (NF)-kB, Nonocyte Chemoacttractant Protein 1 (MCP1), plasminogen activator inhibitor 1 et l'augmentation du stress oxydant. L'infiltration des cellules immunitaires entraine la production excessive d'anion superoxyde et l'expression d'Ang II. Ces derniers contribuent au stress oxydant et à l'HTA (Nava et al. 2003; Rodriguez-Iturbe et al. 2003). Enfin, l'inflammation favorise le développement de la fibrose et, de ce fait, contribue au remodelage vasculaire délétère en diminuant la biodisponibilité de l'oxygène (Kai et al. 2006).

La dysfonction endothéliale est un processus clé du remodelage artériel interne. Elle correspond à l'altération des réponses vasodilatatrices. Elle se caractérise par une réduction de la production ou de la biodisponibilité du NO et une activation de l'agrégation plaquettaire

(Boulanger 1999; Raij 2006). En présence de stimuli biochimiques (bradykinine, acétylcholine) ou mécaniques (contrainte de cisaillement), l'expression de la eNOS augmente ainsi que la production de NO. Cependant, la production des espèces radicalaires de l'oxygène (ROS) par les cellules endothéliales, et spécifiquement de l'anion superoxyde, augmente en cas d'HTA. Or les ROS sont de puissants inhibiteurs des voies vasodilatatrices endothélium-dépendantes : le NO, la prostacycline et l'EDHF (Kojda and Harrison 1999; Feletou and Vanhoutte 2004; Aubin et al. 2006). La dysfonction endothéliale est associée à plusieurs facteurs de risque cardiovasculaire (HTA, diabète, vieillissement, hypercholestérolémie, obésité) (Feletou and Vanhoutte 2006; Munzel et al. 2008; Lee et al. 2016; Selthofer-Relatic et al. 2016). La dysfonction endothéliale est présente au niveau de l'aorte et des artères de résistances chez les patients et les rats hypertendus (Feletou and Vanhoutte 2006).

1.6.2.3. Remodelage vasculaire et HTA

Le remodelage des petites artères serait l'une des premières manifestations dans la physiopathologie de l'HTA. En effet, dans une étude menée par Park et *al*. sur des patients présentant une HTA de stade I, 100% des patients montraient un remodelage des petites artères, alors que seulement 60% avaient une dysfonction endothéliale et 45% une hypertrophie ventriculaire (Park and Schiffrin 2001). Or, la réduction du rapport media/lumière, secondaire au remodelage vasculaire et à la dysfonction endothéliale, est responsable d'une augmentation des résistances périphériques et d'une élévation de la pression artérielle. Ils participent ainsi au développement de l'HTA (Schiffrin 2004).

2. Le remodelage cardiaque

2.1. Hypertrophie cardiaque, un phénomène compensatoire

Comme les vaisseaux, le cœur répond aux changements hémodynamiques en subissant un remodelage. Ce remodelage implique une hypertrophie de la paroi cardiaque d'abord adapté, car il diminue le stress pariétal. Toutefois, dans une situation pathologique, la croissance hypertrophique devient mal-adaptée, car elle évolue progressivement vers une dysfonction contractile et l'insuffisance cardiaque (Swynghedauw 1990). Les mécanismes responsables de la transition de l'hypertrophie adaptée à l'hypertrophie mal-adaptée ne sont pas encore tous définis (Schiattarella and Hill 2015).

2.2. L'hypertrophie physiologique

L'hypertrophie dite « physiologique » survient lors de la croissance, de la grossesse, ou en réponse à un exercice physique prolongé. Elle se caractérise par une fonction contractile normale associée avec une organisation normale de la structure cardiaque (Weeks and McMullen 2011). Elle est transitoire i.e. disparaît en absence de ses stimuli.

Chez l'adulte, l'hypertrophie cardiaque physiologique est modérée, de l'ordre de 10 à 20 % (Schannwell et al. 2002). Lors de la grossesse, elle intervient principalement au cours du troisième semestre et est associée avec une augmentation du volume circulant et du débit cardiaque requis pour la mère et le développement du fœtus (Eghbali et al. 2006). Après la naissance, la croissance du cœur est plus importante. Elle augmente d'au moins deux fois sa masse entre la naissance à l'âge adulte résultant d'une augmentation du diamètre et de la longueur des cardiomyocytes (Janz et al. 2000; Hew and Keller 2003), mais aussi du nombre

de myocytes (pendant la première semaine post-natale). L'hypertrophie cardiaque physiologique, induite par la grossesse ou un exercice, est un processus parfaitement réversible. Ainsi, l'hypertrophie du ventricule gauche disparait 8 semaines après l'accouchement (Eghbali, Wang et al. 2006). De même chez l'athlète de haut niveau, la masse myocardique régresse dans les semaines qui suivent la fin d'un programme d'entrainement intensif (Maron et al. 1993).

2.2.1. Principaux mécanismes moléculaire de l'hypertrophie physiologique du cardiomyocyte

L'hypertrophie physiologique est contrôlée par de multiples facteurs (Figure 4).

Les hormones thyroïdiennes, telles que la triiodothyrosine (T3), augmentent après la naissance et ont un rôle important au cours du développement. En effet, elles régulent la taille et la maturation cardiomyocytes (binucléation), ainsi que l'expression des isoformes de la chaine lourde de la myosine (Lompre et al. 1984) et de sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2 (SERCA2) (Carr and Kranias 2002). Un autre facteur majeur de l'hypertrophie cardiaque physiologique est le ligand Insulin like growth factor 1 (IGF1). Principalement sécrété par le foie en réponse à l'hormone de croissance (GH), IGF1 peut également être produit par les tissus cibles et agir directement de manière autocrine ou paracrine en stimulant la voie pro-hypertrophique PI3K-AKT-mTOR (Kenessey and Ojamaa 2006). IGF1 a été montré essentiel pour la croissance post-natale (Baker et al. 1993) et est induit de façon transitoire suite à un entrainement physique (Neri Serneri et al. 2001).

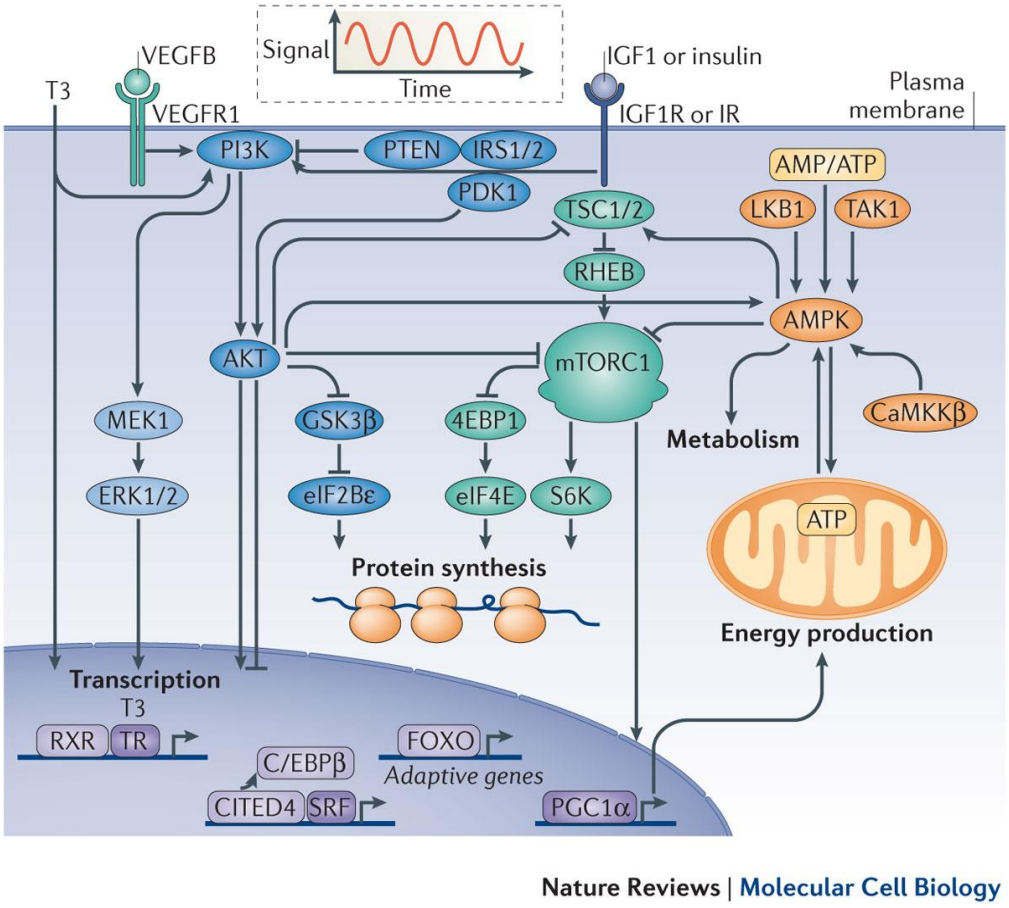


Figure 4 : Les principales voies de l'hypertrophie physiologique (Maillet et al. 2013)

La sérine/thréonine kinase AKT représente la voie principale contrôlant l'hypertrophie physiologique. La délétion d'*Akt1* inhibe la réponse hypertrophique à l'exercice, mais entraîne une hypertrophie plus sévère en réponse à une surcharge de pression (DeBosch et al. 2006), suggérant un rôle crucial de cette voie dans l'hypertrophie physiologique et/ou adaptée. En revanche, si l'activation initiale d'AKT favorise une hypertrophie cardiaque adaptée, son activation soutenue est responsable d'une insuffisance cardiaque à long terme (Shiojima et al. 2005).

2.2.2. Autres déterminants l'hypertrophie physiologique

Outre l'activation des voies d'hypertrophie du cardiomyocyte, l'hypertrophie cardiaque physiologique se caractérise également par une angiogenèse en adéquation avec l'augmentation de la taille des cardiomyocytes et de leurs besoins énergétiques. Ainsi, lors d'un exercice physique, l'augmentation de la capacité du flux sanguin coronaire, du diamètre des artères coronaires et du nombre de capillaires par cardiomyocyte permet une croissance adéquate (Heiss et al. 1976; Pelliccia et al. 1990; Laughlin et al. 2012). Cette réponse angiogénique est médiée par la voie du VEGF notamment (Oka et al. 2014). Lorsque les stimuli hypertrophiques s'arrêtent, à l'exemple du post-partum, le système vasculaire et les cardiomyocytes reviennent à leur état initial (Umar et al. 2012). Cette situation se caractérise par une signalisation anti-angiogénique impliquant l'activation de voie du VEGFR1 (Zhou et al. 2009), ainsi que l'induction de sa forme soluble, sVEGFR1 (Damp et al. 2016; Khan et al. 2016), permettant la régression du système vasculaire.

Il est important de noter que, contrairement à l'hypertrophie pathologique, l'hypertrophie physiologique n'est pas associée au développement de fibrose périvasculaire et interstitielle (Bernardo et al. 2010). L'expression du *Collagène I* demeure faible dans les cœurs de rats entrainés (Burgess et al. 1996), ainsi que l'*α-actine de muscle lisse*, un marqueur de l'activation des myofibroblastes (Jin et al. 2000).

2.3. L’hypertrophie pathologique

2.3.1. Hypertrophie concentrique versus hypertrophie excentrique

En réponse à une HTA, une lésion myocardique ou une activation neurohormonale excessive, l’hypertrophie cardiaque est décrite comme une « hypertrophie pathologique » (Hill and Olson 2008). Il en existe 2 types: 1- concentrique avec l'addition de sarcomères/myofibrilles en parallèle augmentant ainsi l'épaisseur des myocytes, et 2- excentrique, due à l'ajout en série de sarcomères provoquant l’allongement du myocyte (Figure 5). L’hypertrophie concentrique est observée à la suite d’une HTA ou d’une sténose aortique. Elle se caractérise par l’augmentation de l’épaisseur des parois ventriculaires, alors que le volume de la chambre n’est pas affecté. L'hypertrophie est proportionnelle à l’augmentation de la pression systolique intraventriculaire. Lorsque le stress pariétal est normalisé (application de la loi de Laplace), il existe une demande cardiaque en oxygène plus importante en raison de l'augmentation de la masse. A l’inverse, la surcharge de volume, provoquée par une insuffisance aortique ou mitrale, entraîne une hypertrophie excentrique par dilatation de la chambre ventriculaire avec peu ou aucun effet sur l'épaisseur de paroi.

A long terme, la sténose aortique prolongée conduit à une élévation de la pression télé-systolique et une dilatation du ventricule gauche, ce qui suggère que l'hypertrophie concentrique peut finalement dégénérer en un mode excentrique et conduire à l’insuffisance cardiaque (Opie et al. 2006). Ainsi, l’hypertrophie initiale est perçue comme un mécanisme compensatoire qui pourrait être bénéfique dans un premier temps. Comme l’hypertrophie ventriculaire est connue pour être un facteur de risque cardiovasculaire (insuffisance cardiaque, arythmies) (Levy et al. 1990; Koren et al. 1991), de nombreuses études cliniques ou fondamentales proposent l’inhibition de l’hypertrophie ventriculaire comme une stratégie

thérapeutique de prévention de l'insuffisance cardiaque (Frey et al. 2004; van Berlo et al. 2013). Ce concept est aujourd'hui encore controversé (Crozatier and Ventura-Clapier 2015).

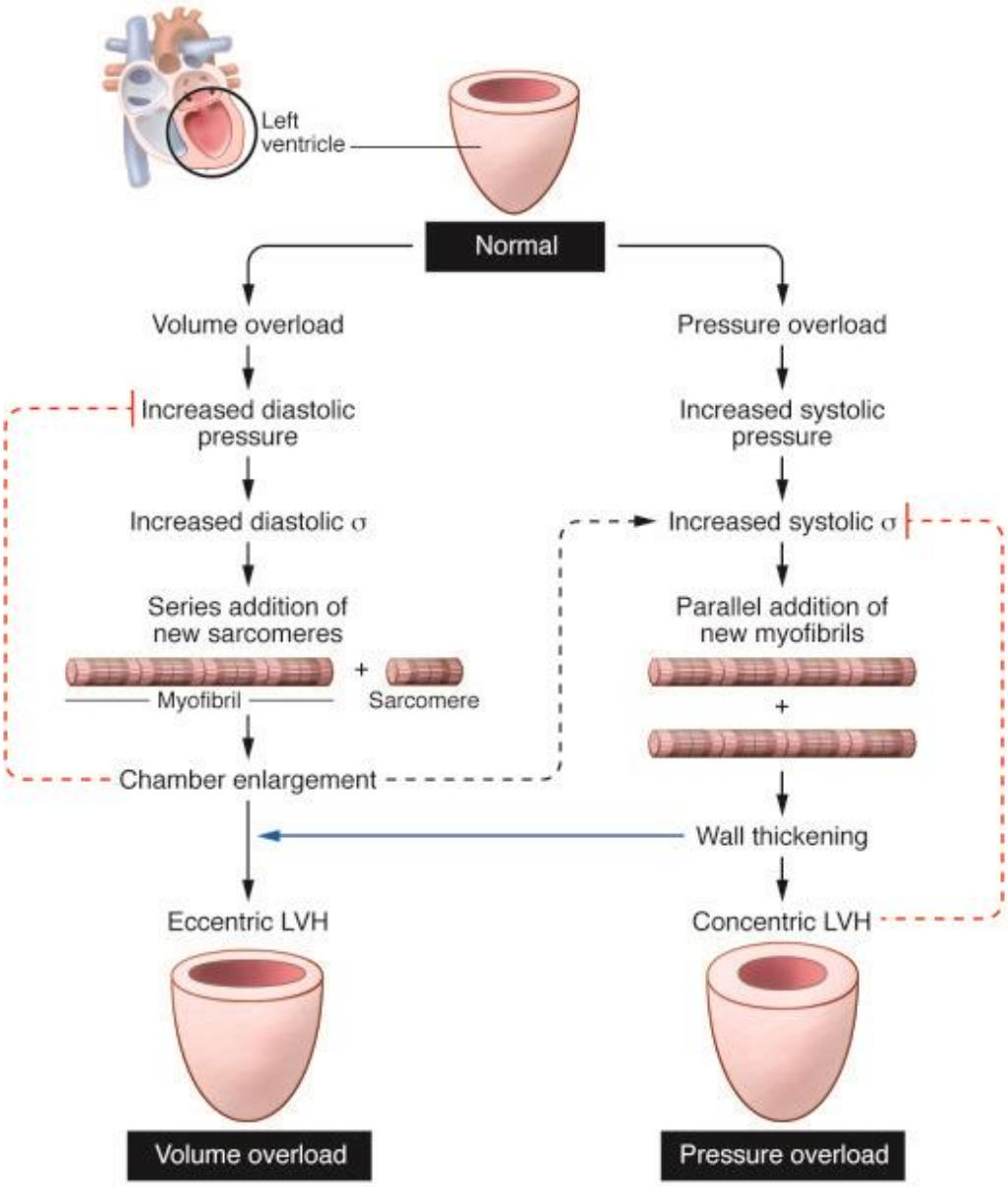


Figure 5 : Mécanismes d'action responsables des hypertrophies ventriculaires concentriques ou excentriques (Grossman and Paulus 2013)

2.3.2. Les intervenants de l'hypertrophie cardiaque pathologique

2.3.2.1. Principaux mécanismes moléculaires de l'hypertrophie pathologiques du cardiomyocyte

Quel que soit l'origine du stimulus, l'hypertrophie pathologique cardiaque est associée à une augmentation du Ca^{2+} cytosolique. Ce Ca^{2+} est un élément clé de l'activation des voies de calcineurine/nuclear factor of activated T cells (NFAT) et calmodulin-dependant kinase II (CAMKII) dans le cardiomyocyte (Figure 6).

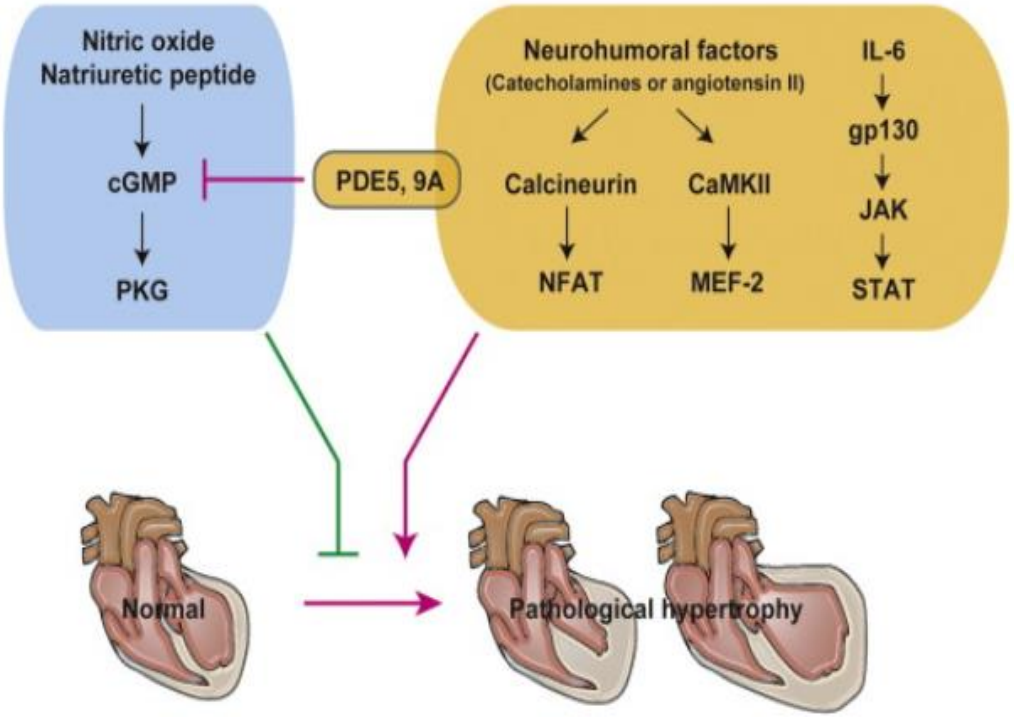


Figure 6 : Voies de signalisation du cardiomyocyte impliquées dans le remodelage hypertrophique pathologique (Shimizu and Minamino 2016)

La calcineurine est une phosphatase sérine/thréonine qui déphosphoryle notamment le facteur de transcription NFAT, permettant ainsi sa translocation au noyau, et l'expression d'un programme génique spécifique dit programme fœtal. Cette voie a été montrée nécessaire et suffisante pour induire une hypertrophie cardiaque pathologique (Wilkins and Molkentin 2004). CAMKII, quant à elle, est une sérine/théonine kinase qui induit l'hypertrophie des cardiomyocytes via la phosphorylation des histones déacétylases (HDACs), notamment HDAC4 et HDAC5, ce qui conduit à une diminution de l'expression des gènes induite par MEF-2 (Passier et al. 2000; Zhang et al. 2002).

D'autres médiateurs à activité kinase ont été rapportés dans l'hypertrophie cardiaque pathologique comme P38 (Nishida et al. 2004), ERK1/2 (Kehat et al. 2011) et c-JNK (Liang et al. 2003), appartenant à la cascade MAPK. Les catécholamines peuvent aussi activer l'adénylate cyclase (AC) puis la protéine kinase A (PKA) qui phosphorylera un ensemble de cibles intracellulaires et conduira à une libération accrue de Ca^{2+}, base de l'effet inotrope.

2.3.2.2. La fibrose

Outre l'hypertrophie du cardiomyocyte, le remodelage de la matrice extracellulaire et le développement de la fibrose via l'accumulation de collagènes sont également des éléments majeurs du remodelage cardiaque pathologique. Ainsi, le stress mécanique induit l'activation des fibroblastes cardiaques qui sont responsables d'une production accrue de composants de la MEC et de molécules bioactives (MacKenna et al. 2000) tels que le TGF-ß, qui joue un rôle majeur (Leask and Abraham 2004). L'accumulation de MEC entraine une distorsion de l'architecture cardiaque et diminue la compliance cardiaque (Weber 2000; Espira and Czubryt 2009). La fibrose peut être également responsable d'altérations du couplage mécano-électrique du cardiomyocyte, contribuant ainsi à la survenue de troubles du rythme (Spach and Boineau 1997).

2.3.2.3. L’inflammation et le stress oxydant

L'inflammation a un rôle physiopathologique important dans les complications de nombreux processus comme l’HTA et les maladies d’ordre vasculaire (Brasier et al. 2002; Nagai et al. 2011). Au cours de l’inflammation, les macrophages activés sécrètent des cytokines telles que le facteur de nécrose tumorale (TNFα), l’Interleukine-1ß et l’Interleukine-6. Le niveau d’expression de ces cytokines est corrélé à la sévérité de l’insuffisance cardiaque (Rosenkranz et al. 2002). Par ailleurs, la délétion de ces cytokines prévient l’hypertrophie cardiaque, la fibrose et l’inflammation induite par l’Ang II (Kubota et al. 1997; Honsho et al. 2009; Ma et al. 2012). L’inflammation contribue à la production des ROS et à l’épuisement des agents antioxydants, favorisant ainsi la balance vers le stress oxydant. Or, comme déjà décrit, ce dernier joue un rôle dans la dysfonction endothéliale et le remodelage vasculaire, et contribue aux effets délétères liés à l’HTA (Vaziri 2008; Munzel et al. 2015). En retour, le stress oxydant favorise l'inflammation en activant le NF-kappa B qui déclenche la sécrétion de diverses cytokines pro-inflammatoires, chémokines et molécules d’adhésion (Rodriguez-Iturbe et al. 2004). L’inflammation, médiée par les macrophages, intervient également dans le processus de fibrose (Figure 7). En effet, une fois activés, les macrophages peuvent sécréter des molécules pro-inflammatoires telles que l’ostéopontine et la galectine-3 qui favorisent en retour la production de collagène par les fibroblastes (Sharma et al. 2004; Zhang et al. 2008).

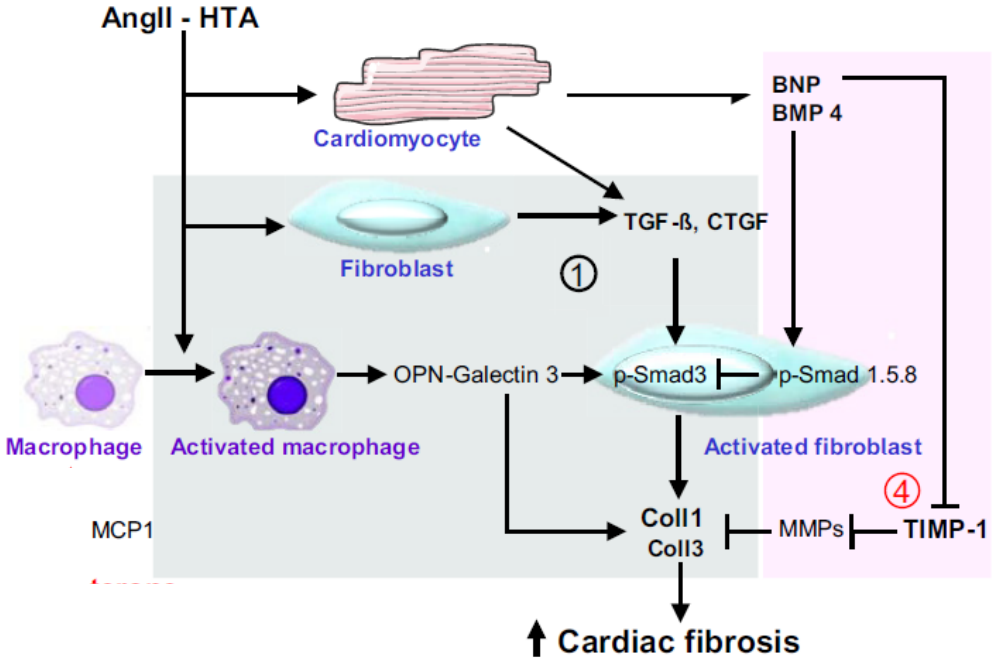


Figure 7 : Implication de l'inflammation médiée par les macrophages dans le remodelage pathologique cardiaque (Azibani et al. 2012).

3. La voie de signalisation Notch

3.1. Généralités

La voie de signalisation Notch est une voie de communication intercellulaire majeure très conservée au cours de l'évolution. Initialement découverte chez la drosophile, car une mutation hétérozygote chez la femelle induisait une encoche (« notch » en anglais) au niveau de l'aile, la voie Notch est, par la suite, apparue comme un régulateur clé lors du développement embryonnaire des organismes vertébrés et invertébrés. Notch est également impliqué dans de nombreux processus cellulaires tels que la différenciation, l'activation, l'apoptose et la prolifération d'un grand nombre de types cellulaires au long de la vie adulte (Artavanis-Tsakonas et al. 1999).

3.1.1. Les ligands

La signalisation Notch est essentiellement induite par la famille de ligands DSL, caractérisée par un domaine DSL pour Delta, Serrate et Lag2 (Figure 8). Chez les mammifères, 5 ligands de Notch ont été identifiés et classés en deux familles, Delta-like (Delta-Like 1, 3 et 4) et Jagged (Jagged 1 et 2) par homologie des deux ligands présents chez la drosophile, Delta et Serrate (Kopan and Ilagan 2009). Les ligands de Notch sont des protéines transmembranaires de type I (un segment transmembranaire) avec un domaine extracellulaire contenant des séquences répétées de type Epidermal Growth Factor (EGF)-like et un domaine N-terminal DSL riche en cystéines. Ce domaine DSL est un motif retrouvé dans tous les ligands. Il assure une fonction essentielle dans l'interaction directe cellule-cellule avec le récepteur Notch (Shimizu et al. 1999).

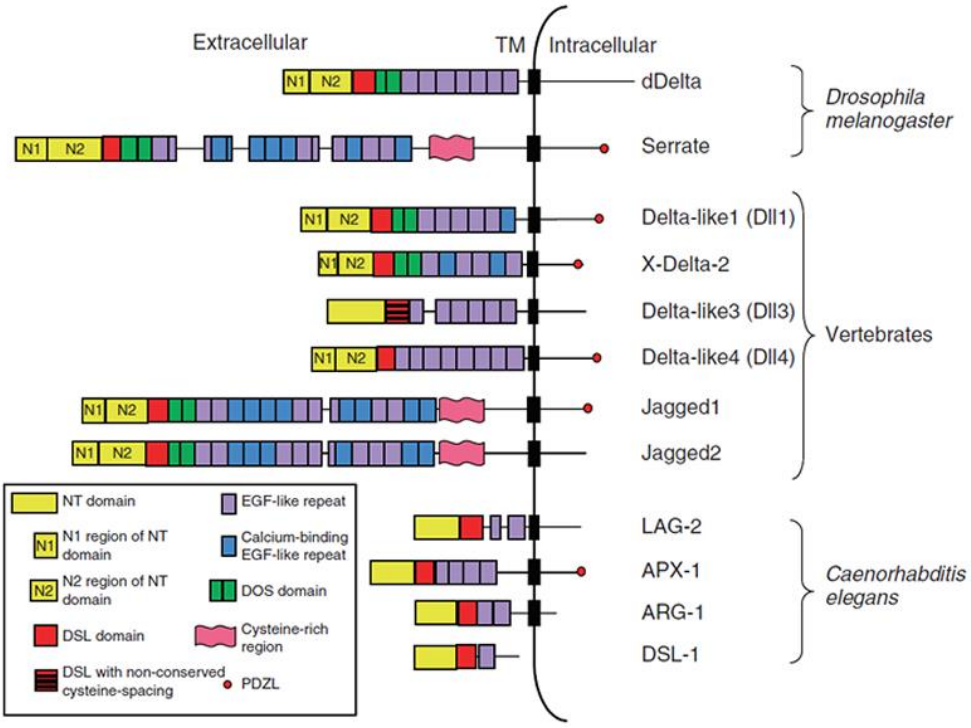


Figure 8 : Structure des différents ligands de Notch suivant les espèces animales (D'Souza et al. 2010)

3.1.2. Les effecteurs

Chez les mammifères, les gènes médiateurs de la voie canonique de Notch sont les gènes de la famille HES (Hairy and Enhancer of Split) et HEY (Hairy and Enhancer of split with YRPW motif). 7 gènes HES (HES 1 à 7) et 3 gènes HEY (HEY 1 à 3) sont connus, mais seuls 3 des gènes HES (HES1, -5 et -7), ainsi que les 3 gènes HEY ont été caractérisés comme des cibles directes de Notch. HES et HEY composent deux familles de répresseurs de la transcription possédant un domaine hélice-boucle-hélice basique (basic helix-loop-helix (bHLH)) et un domaine Orange (Iso et al. 2003). Le domaine bHLH comprend deux régions : une région basique de liaison à l'ADN et une région HLH impliquée dans la dimérisation, tandis que le domaine Orange agit dans la sélection du partenaire du domaine bHLH (Kageyama et al. 2007). *HES* et *HEY* sont exprimées dans de nombreux tissus et ont un rôle

clé au cours de l'ontogenèse en participant notamment au développement du système nerveux, du système cardiovasculaire ou des lymphocytes.

Au niveau vasculaire, *HEY1* et *HEY2* sont exprimés dans l'aorte et les artères pulmonaires (Chin et al. 2000). Ils ont été montrés requis pour le développement vasculaire embryonnaire (Fischer et al. 2004). De même, HEY2 est impliqué dans la prolifération, la migration et la formation du réseau de cellules endothéliales (Henderson et al. 2001). Concernant la famille HES, il est montré que HES1 et HES5 ont un rôle dans le remodelage vasculaire et la spécification endothéliale au cours du développement vasculaire cérébral (Kitagawa et al. 2013).

Outre les familles *HES* et *HEY*, d'autres gènes cibles directs des récepteurs Notch ont été identifiés tels que *GATA3* (Fang et al. 2007), *NRARP* (Notch-Regulated-Ankyrin-Repeat Protein) (Lamar et al. 2001) ou l'*Ephrine B2* (Iso et al. 2006), mais ils seraient exprimés dans des situations particulières (Lymphocyte T pour *GATA3* ou angiogenèse pour *Ephrine B2*). D'autres cibles potentielles ont été également proposées *in vitro* telles que l'*α-actine du muscle lisse* (Noseda et al. 2006) ou la *chaîne lourde de la myosine du muscle lisse* (Doi et al. 2006).

3.1.3. Les récepteurs

Comme les ligands, les récepteurs Notch sont des protéines transmembranaires de type I à multidomaines conservés chez les vertébrés et les invertébrés. Chez les mammifères, 4 récepteurs Notch ont été mis en évidence (NOTCH 1, 2, 3 et 4) (Figure 9). Ils sont caractérisés par un domaine extracellulaire (NECD) et un domaine intracellulaire (NICD) qui leur confèrent respectivement un rôle dans la reconnaissance du ligand et la signalisation intracellulaire (Hofmann and Iruela-Arispe 2007). Ces 2 domaines sont unis par des liaisons non covalentes. Le domaine extracellulaire comprend de 29 à 36 répétitions EGF-like identifiées dans la fonction de Notch (Rana and Haltiwanger 2011). Parmi ces répétitions, les séquences 11-12 ont été montrées nécessaires et suffisantes pour les interactions ligand-récepteur (Rebay et al. 1991). Le NECD est suivi par une région régulatrice négative (NRR) composée de 3 répétitions Notch Lin-12/Notch (LNR) riches en cystéines et d'un domaine d'hétérodimérisation. Ce NRR préviendrait l'accès des métalloprotéinases au site de clivage S2 de Notch en l'absence de ligand (Bray 2006). Enfin, le NICD est composé d'un domaine RAM (RBP-Jk-associated molecule), de répétitions ankyrine associées à 2 séquences de signaux de localisation nucléaire (NLS), ainsi que d'un domaine PEST (Pro-Glu-Ser-Thr) dans sa partie C-terminale.

Initialement, les récepteurs Notch sont traduits sous forme d'un monomère. Ils sont ensuite clivés au niveau du NECD (clivage S1) dans le Golgi par la Furine (Logeat et al. 1998). Ce NECD subit, lors de sa sécrétion, une O-Glycosylation essentielle pour la conformation du récepteur et l'interaction avec son ligand (Rana and Haltiwanger 2011).

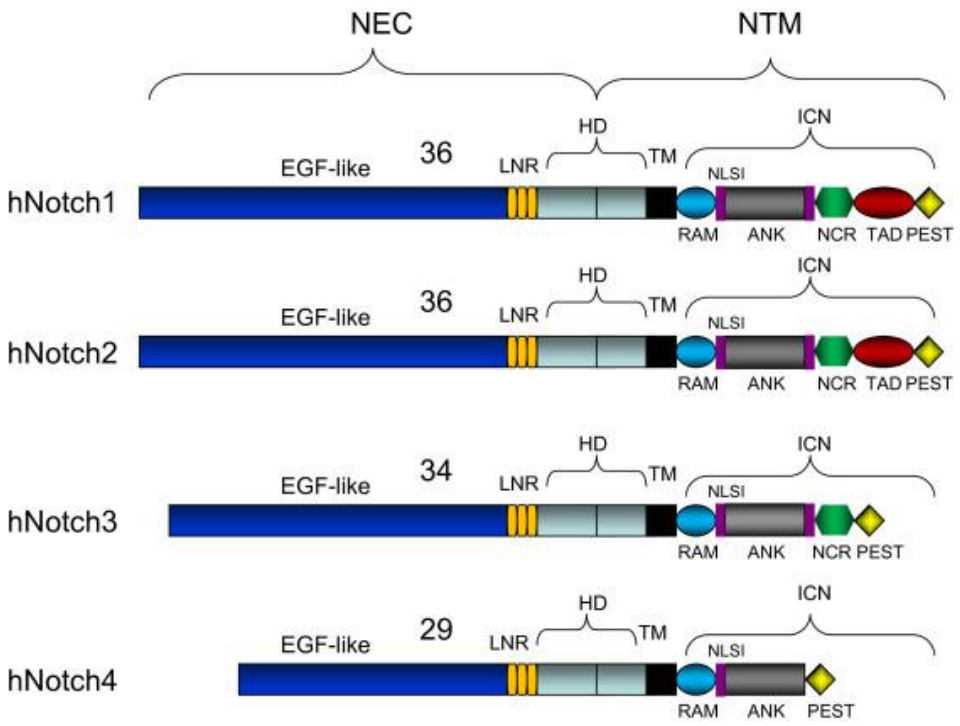


Figure 9 : Structure des récepteurs Notch chez l'Homme (Pancewicz and Nicot 2011)

3.1.4. La cascade de signalisation de Notch

La voie de signalisation de Notch repose sur le contact direct du ligand avec son récepteur, tous deux transmembranaires, permettant les échanges de signaux entre deux cellules voisines (une cellule émettrice et une cellule réceptrice, Figure 10). L'activation de Notch est caractérisée par une succession de clivages protéolytiques. Le premier est catalysé par une métalloprotéinase de la famille ADAM/TACE/Kuzbanian (clivage S2) qui libère le NECD de la membrane plasmique (Brou et al. 2000). Alors que le fragment extracellulaire lié au ligand est internalisé par la cellule émettrice, les segments transmembranaires et intracellulaires subissent 2 étapes de clivages dans le domaine transmembranaire (clivages S3 et S4). Ces clivages, médiés par le complexe γ-sécrétase comprenant les Présénilline1-2, Pen-2, Aph-1 et Nicastrine (De Strooper et al. 1999; Struhl and Greenwald 2001; Francis et al. 2002; Hu et al. 2002), libèrent le NICD dans le cytosol. Grâce à ses 2 séquences signales de

localisation nucléaire, le NICD est transloqué au noyau où il forme un complexe avec le facteur de transcription CSL (CBF1/Su(H)/Lag-1 ou RBPJk chez les mammifères) et le co-activateur Mastermind. En absence de NCID, CSL forme des complexes avec une multitude de corépresseurs qui inhibent la transcription des gènes cibles de Notch à l'état basal (Bray 2006; Kopan and Ilagan 2009).

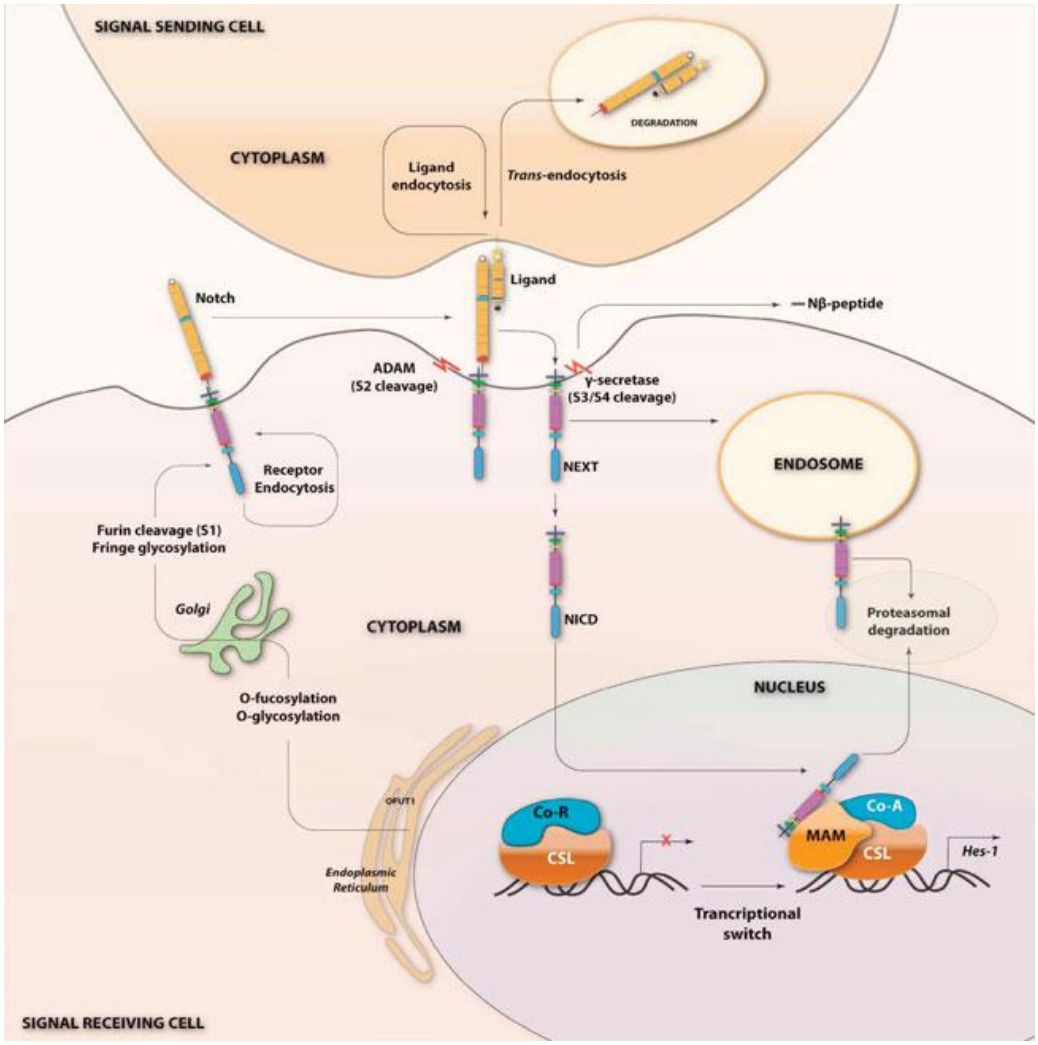


Figure 10 : La voie canonique des Notch (Yavropoulou and Yovos 2014) entre une cellule émettrice exprimant le ligand Delta Like/Jagged (signal sending cell) et une cellule réceptrice exprimant le récepteur Notch (signal receiving cell).

3.2. Rôle de la voie Notch dans le système cardiovasculaire

3.2.1. Notch et le développement cardiovasculaire

La voie de signalisation Notch a un rôle important lors du développement cardiaque. Notch1 et Notch2 sont les formes prédominantes dans le cœur en développement, alors que Notch3 est limité aux cellules musculaires lisses et Notch4 aux cellules endothéliales vasculaires (Swiatek et al. 1994; McCright et al. 2001). L'invalidation de la voie Notch, via la délétion de *RBPJκ*, n'entraine pas d'anomalies de développement jusqu'au stade de tube cardiaque primitif indiquant que cette voie de signalisation n'est pas nécessaire dans la spécification du lignage cardiaque (Souilhol et al. 2006). En revanche, les expressions de *Notch1*, *Notch2* et *Delta-Like1* ont été montrées requises pour la détermination de la latéralisation gauche-droite du cœur. Notch agit également sur la morphogenèse des coronaires, notamment au niveau de l'épicarde embryonnaire. En effet, l'activité de Notch apparaît nécessaire à la maturation de la paroi vasculaire lors du développement des coronaires (del Monte et al. 2011). La voie de signalisation Notch est aussi requise pour la différenciation artério-veineuse (Lawson et al. 2001) et participe à la spécification des cellules endothéliales en cellules endothéliales artérielles ou veineuses (Fischer, Schumacher et al. 2004; Krebs et al. 2004).

Des mutations gain ou perte de fonction de composants de la voie Notch ont été identifiées comme étant responsables de malformations cardiaques (Table 2). Ainsi, des mutations de *Notch1* sont à l'origine de malformations du type bicuspidie valvulaire aortique ou calcifications de valve aortique liées à un défaut de transition épithélial-mésenchymateuse (Sciacca et al. 2013) Par ailleurs, des mutations de *Notch2*, *Jagged1*, ou *HEY2* sont associées au syndrome d'Alagille, une maladie génétique autosomale dominante affectant différents organes dont le cœur. Les anomalies cardiaques incluent des défauts de septum ventriculaire

et une hypertrophie droite conséquence d'une sténose des artères pulmonaires périphériques. (Kamath et al. 2012).

Table 2: Implication des mutations touchant les différents composants de la voie Notch dans les pathologies cardiovasculaires. (Zhou and Liu 2014)

Congenital heart disease	Gene mutation
Aortic valve degenerative disease	RBP-Jκ
Left ventricular outflow tract defects	Notch 1
Bicuspid aortic valve disease	Notch 1-4, Jagged 1, Hes 1, Hey 1, Hey 2
Aortic valve calcification	Notch 1, Hey 1, Hey 2
Pulmonic stenosis	Jagged 1
Tetralogy of Fallot	Jagged 1
Mitral valve disease	HRT 2
Tricuspid valve disease	HRT 2
Ventricular septal defect	HRT 2
Atrial septal defect	HRT 2
Pericardial distension	Notch 1, RBP-Jκ
Alagille syndrome	Notch 2, Jagged 1, HRT 2, Hey 2

RBP-Jκ: recombination signal binding protein for immunoglobulin Jκ region; Hes: hairy and enhancer of split: Hey: hairy/enhancer of split-related with YRPW motif; HRT: hairy-related transcription.

3.2.2. Notch et le cœur au stade post-natal

Après la naissance, la voie Notch est silencieuse dans le cœur en conditions physiologiques. Elle est cependant réactivée en réponse à une surcharge hémodynamique ou une lésion myocardique, ce qui suggère un rôle dans la réparation cardiaque (Croquelois et al. 2008; Oie et al. 2010; Nemir et al. 2014). Parmi les récepteurs Notch, Notch1 a été décrit comme le principal récepteur impliqué dans la réponse cardiaque face à un stress. Il

permettrait l'augmentation de la survie cellulaire et la prolifération des précurseurs cardiaques en contrôlant la différenciation cardiogénique et en réduisant la fibrose interstitielle (Croquelois, Domenighetti et al. 2008). Après un infarctus du myocarde, les cardiomyocytes dans la zone bordante de l'infarctus sur-expriment Notch1, ce qui est associé à une augmentation de la phosphorylation d'AKT et une réduction de l'apoptose (Gude et al. 2008).

3.2.3. Notch et le système vasculaire

Alors que le rôle des récepteurs Notch et des ligands dans le développement du système vasculaire est bien établi (Rizzo et al. 2013), leurs implications dans les processus de vascularisation après la naissance sont moins connus.

Notch1, 2 et 4 ainsi que Delta-like 1,4 et Jagged 1,2 moduleraient l'angiogenèse après la naissance et sont exprimés dans l'endothélium au stade adulte (Rizzo, Miele et al. 2013). La voie Delta-like-4/Notch1 contrôle l'angiogenèse, induite par le VEGFA, en limitant le nombre d'embranchements formés par les cellules endothéliales. En diminuant l'expression du récepteur du VEGFA, le VEGFR2, la voie Delta-like 4/Notch1 contrôle ainsi, au cours de l'angiogenèse, la proportion de « tip cells » (cellules endothéliales responsables de la formation du nouveau vaisseau) et de « stalk cells » (cellules endothéliales formant la lumière du vaisseau) (Dufraine et al. 2008). De même, une stimulation de *Jagged-1* module la transition endothélio-mésenchymateuse (Noseda et al. 2004). Par ailleurs, la voie Notch, au niveau des cellules endothéliales, aurait un rôle important dans la protection contre la mort cellulaire induite par l'inflammation, les changements hémodynamiques ou l'ischémie.

La signalisation Notch intervient également dans la régulation des CMLV. Notch1 et Notch3 sont les récepteurs clé de la différenciation des CMLV (Sweeney et al. 2004) en

contrôlant l'expression génique des protéines contractiles (*α-actine de muscle lisse (ACTA2), calponine, chaine lourde de la myosine de muscle lisse et smootheline*) (Proweller et al. 2005; Morrow et al. 2008). Cependant, des données contradictoires sont rapportées concernant l'activité inhibitrice ou activatrice de ce processus. HEY1 et HEY2 agissent comme répresseurs de l'expression d'ACTA2 *in vitro* (Tang et al. 2008), alors que le promoteur d'*ACTA2* qui est une cible directe de Notch/RBPJκ, est contrôlé positivement par l'activation de Notch dans les CMLV (Noseda, Fu et al. 2006). Il est proposé que l'activation de la voie Notch et de ses effecteurs contrôle finement le phénotype des CMLV puisque HES/HEY agissent par rétrocontrôle négatif pour limiter l'expression des cibles directes de Notch. Par ailleurs, Notch régule positivement la survie et la prolifération des CMLV (Sweeney, Morrow et al. 2004).

3.3. Notch3, rôles physiologiques et pathologiques

Localisé sur le chromosome 19 chez l'Homme et 17 chez la souris, le gène *Notch3* est principalement transcrit dans les CMLV artérielles et les péricytes (Villa et al. 2001; Krebs et al. 2003). De nombreuses études ont porté sur le rôle de Notch3 dans la l'homéostasie des CMLV (différenciation, prolifération, migration et survie cellulaire). Cependant, nombres d'entre elles ont été réalisées *in vitro* à l'aide de lignées cellulaires de CMLV. Or, il est connu que les effets de la voie Notch peuvent être très différents selon le type cellulaire et son micro-environnement (Morrow, Guha et al. 2008). Une hypothèse est que cet aspect « multifacette » de la voie Notch expliquerait les divergences de résultats concernant le rôle de Notch3 dans les phénomènes décrits ci-après.

3.3.1. Rôle de Notch3 dans la physiologie des CMLV

3.3.1.1. Notch3 et le phénotype des CMLV

Pour mieux comprendre le rôle de Notch3 dans les CMLV, des souris invalidées pour ce gène ont été générées (Krebs, Xue et al. 2003). L'absence de *Notch3* n'est pas létale chez la souris, indiquant que son expression n'est pas requise pour le développement embryonnaire.

A la naissance, lorsque le réseau artériel est encore immature, le réseau artériel des souris *Notch3*$^{-/-}$ est comparable à celui des souris Wild-Type. Durant les 4 semaines de croissance qui suivent, les artères se développent, leurs CMLV changent de forme et d'orientation autour de la lumière pour s'adapter aux nouvelles conditions de charge hémodynamique. Or, ce remodelage est absent chez les souris *Notch3*$^{-/-}$ (Domenga, Fardoux et al. 2004). Ainsi, à l'âge adulte, les artères des souris *Notch3*$^{-/-}$ présentent des défauts structurels tels qu'une lumière élargie, une média plus fine et des CMLV désorganisées autour de la lumière. Ces défauts se retrouvent dans tous les organes observés avec un effet moindre dans les artères de conductance comme l'aorte, suggérant un rôle de Notch3 prédominant dans les artères de résistance.

En l'absence de *Notch3*, les CMLV des artères de résistance des souris *Notch3*$^{-/-}$ adultes présentent un phénotype altéré avec une diminution d'expression des gènes codant des protéines impliquées dans la contractilité (*calponine, SM22α*…) (Domenga, Fardoux et al. 2004), suggérant que Notch3 favoriserait la différenciation des CMLV. L'activité de Notch3 dans les CMLV serait dépendante de l'expression de Jagged-1 dans les cellules endothéliales (Liu et al. 2009). Cependant, les analyses *in vitro* apportent des résultats contradictoires concernant l'activité de Notch et le phénotype des CMLV (Proweller, Pear et al. 2005; Liu,

Kennard et al. 2009). Ces divergences seraient liées à l'effet contexte-dépendant qui influence fortement la signalisation Notch.

L'altération du phénotype des CMLV chez les souris *Notch3*$^{-/-}$ est à l'origine de la diminution du tonus myogénique et de l'augmentation de la dilatation induite par le débit (Belin de Chantemele, Retailleau et al. 2008). Ce rôle de Notch3 dépend du lit vasculaire concerné : s'il est essentiel à l'intégrité de vaisseaux de résistance, telle que l'artère caudale ou cérébrale, l'importance de Notch3 serait moindre non seulement dans les vaisseaux de conductance mais aussi dans certaines artères de résistance comme l'artère mésentérique. Par ailleurs, l'injection d'agents vasoconstricteurs/vasodilatateurs a des effets similaires sur les artères de résistance des souris *Notch3*$^{-/-}$ et WT, suggérant que la délétion de *Notch3* n'entraine pas d'atteinte fonctionnelle totale de l'artère de résistance.

Au niveau moléculaire, les artères des souris *Notch3*$^{-/-}$ présentent une moindre activité RhoA/Rho et une phosphorylation diminuée de la chaîne légère de la myosine (Belin de Chantemele, Retailleau et al. 2008). Or, la voie RhoA/Rho est impliquée dans la sensibilisation de l'appareil contractile à la vasoconstriction par l'Ang II, la phényléphrine et le thromboxane A2 (Loirand et al. 2006). Dans les cellules épithéliales, RhoA médie l'adhésion cellule-cellule induite par E-Cadhérine. Ainsi, l'inactivation de RhoA entraîne une dislocation d'E-cadhérine et des protéines associées dans la jonction, induisant une perte de l'adhésion cellule-cellule (Takaishi et al. 1997). Cette moindre activité de RhoA chez les souris *Notch3*$^{-/-}$ peut être certainement reliée aux défauts de tonus myogénique et de structure observés dans les CMLV artérielles.

3.3.1.2. Notch3 et la prolifération, migration et survie des CMLV

Notch3 et survie cellulaire

L'implication de Notch3 dans le maintien de l'intégrité des CMLV est bien établie (Henshall et al. 2015). Notch3 protège de l'apoptose et favorise la survie des CMLV via deux mécanismes. En effet, Campos *et al* ont montré *in vitro* que des cellules exprimant un N3ICD constitutivement actif induisaient c-Flip, un inhibiteur apoptotique empêchant la liaison de la caspase-8 au récepteur Fas (Campos et al. 2002). De plus, selon Sweeney *et al*, l'effet anti-apoptotique de Notch3 ferait intervenir la voie canonique de Notch via le facteur de transcription CBF1/RBP-Jk (Sweeney, Morrow et al. 2004). Cependant, l'effet anti-apoptotique de Notch3 varierait selon le lit vasculaire comme lors de la différenciation cellulaire. En effet, si aucune CMLV en apoptose n'a été observée dans l'artère caudale des souris *Notch3*$^{-/-}$ (Domenga, Fardoux et al. 2004); des CMLV positives pour la caspase-3 clivée, signe d'activation des voies apoptotiques, sont détectées dans la rétine et le cerveau (Liu et al. 2010; Henshall, Keller et al. 2015).

Notch3 prolifération et migration cellulaire

Concernant la prolifération cellulaire, s'il existe un consensus selon lequel la signalisation de Notch3 favorise la prolifération des CMLV, plusieurs mécanismes d'action sont proposés. En utilisant un modèle de transfection stable de CMLV *in vitro*, Campos *et al* ont noté que la prolifération des cellules dépendante de Notch3 serait liée à la répression de p27^{KIP}, un inhibiteur critique du cycle cellulaire (Campos, Wang et al. 2002). Par ailleurs, Sweeney *et al* ont montré que la prolifération élevée des CMLV impliquait la voie CBF1/RBPJκ via l'induction des effecteurs HEY1 et HEY2 et faisait donc intervenir la voie de signalisation canonique de Notch (Sweeney, Morrow et al. 2004). Mais il demeure à définir si la diminution d'expression de p27^{KIP} est directement liée à l'activation de

CBF1/RBPJκ. Plus récemment, plusieurs études, utilisant des CMLV isolées d'artères pulmonaires, mettent en évidence l'implication de l'effecteur *HES5* comme médiateur de la prolifération cellulaire induite par Notch3, ce qui favoriserait le développement d'une hypertension artérielle pulmonaire (Li, Zhang et al. 2009). Enfin, l'activation constitutive de N3ICD inhibe la migration des CMLV via l'activité transcriptionelle de RBPJκ (Sweeney, Morrow et al. 2004).

Si dans les conditions physiologiques, Notch3 est restreint aux CMLV, il peut être induit dans d'autres types cellulaires où il modulerait la prolifération et la survie des cellules en particulier dans le contexte du cancer.

Ainsi, de nombreuses observations rapportent une surexpression de *Notch3* dans de divers types de cellules cancéreuses chez l'Homme, qui est corrélée à une évolution rapide de la maladie (Dang et al. 2000; Park et al. 2006; Yamaguchi et al. 2008; Ozawa et al. 2014). L'induction de Notch3 activerait la croissance tumorale en favorisant la prolifération et la survie cellulaires via le ligand Jagged 1 (Choi et al. 2008). L'utilisation de siRNA spécifique ou d'inhibiteur de la γ-secretase pour bloquer l'activation de Notch3 réduit la prolifération tumorale dans les cancers du poumon (Lin et al. 2010), des ovaires (Park, Li et al. 2006; Konishi et al. 2007) ou le sarcome Kaposi (Curry et al. 2005), faisant de Notch3 une cible thérapeutique potentielle pour les thérapies anticancéreuses.

3.3.2. Implication de Notch3 en pathologie humaine

3.3.2.1. Notch3 et CADASIL

L'importance de la voie Notch3 chez l'Homme a tout d'abord été mise en évidence dans le cadre de la maladie CADASIL.

CADASIL (Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy) est une affection héréditaire autosomique dominante des petites artères cérébrales responsable d'infarctus sous-corticaux et d'une atteinte de la substance blanche (leucoencéphalopathie). Elle se caractérise par l'apparition de troubles neurologiques associant migraines avec aura, troubles de l'humeur et troubles cognitifs en rapport avec la survenue d'accidents vasculaires cérébraux ischémiques. Les premiers symptômes de la maladie apparaissent généralement entre 20 et 30 ans. Des lésions ischémiques sont observées vers 50 ans chez 70 à 80% patients et une démence est quasiment toujours retrouvée à la phase terminale de la maladie (Chabriat et al. 1995; Dichgans et al. 1998; Desmond et al. 1999).

Anomalies structurales du CADASIL

Au microscope, l'analyse tissulaire révèle la présence de petits infarctus avec infiltration macrophagique au niveau de la substance blanche (Ruchoux and Maurage 1997). Les vaisseaux artériels présentent un épaississement de la paroi vasculaire, dont l'ampleur est variable selon la localisation, et par une dégénérescence des CMLV. L'endothélium est morphologiquement respecté. Les lésions de la média sont responsables d'une réduction de la lumière vasculaire (Baudrimont et al. 1993). La caractéristique typique de CADASIL est la présence de dépôts dans la média s'étendant à l'adventice (Ruchoux et al. 1995; Bergmann et al. 1996). Ces dépôts ne sont pas observés seulement dans les vaisseaux du cerveau, mais dans tous les tissus analysés (rate, foie, reins, muscle, coeur et peau) (Ruchoux et al. 1994; Ruchoux, Guerouaou et al. 1995; Ruchoux and Maurage 1997; Lesnik Oberstein et al. 2003). Les analyses histologiques ne détectent pas la présence d'élastine, de substances amyloïdes ou d'immunoglobulines. En revanche, la positivité en coloration PAS suggère la présence de glycoprotéines (Ruchoux, Guerouaou et al. 1995; Ruchoux and Maurage 1997). En microscopie électronique, ces dépôts contiennent un matériel granulaire osmiophile (granular

osmiophilic material ou GOM) qui apparaît dense, mais de composition alors inconnue. En 2006, Ishiko *et al* ont pu démontré que le domaine extracellulaire de Notch3 était un élément constitutif majeur de ces GOMs (Ishiko et al. 2006).

CADASIL et Notch3

C'est en 1996 que NOTCH3 a été identité comme le gène en cause dans CADASIL (Joutel, Corpechot et al. 1996). A ce jour, plus d'une centaine de mutations NOTCH3 responsables de CADASIL ont été identifiées. La totalité de ces mutations touchent les exons se situant dans les domaines EGG du domaine extracellulaire de Notch3. Environ 95% des mutations rapportées sont de type faux-sens (missense) et concernent la perte ou le gain d'un résidu cystéine (Cys) dans un motif EGF. Les mécanismes, par lesquels les mutations de Notch3 conduisent au phénotype vasculaire de CADASIL, demeurent cependant mal compris. Les anomalies artérielles observées pourraient être secondaires à une altération de la voie de signalisation Notch3 par un effet dominant négatif, une conséquence indirecte de l'accumulation de N3ECD au sein des GOMs ou résulter d'une combinaison de ces deux mécanismes (Joutel 2011).

Manifestations cardiaques de CADASIL

Les altérations vasculaires ne se limitent pas aux artères cérébrales, comme décrit précédemment. Elles sont présentes au niveau des artères de moyen et petit calibre dans presque tous les organes étudiés, traduisant le caractère systémique de la maladie.

Peu d'études se sont intéressées au phénotype cardiaque des patients CADASIL. En 2003, Oberstein *et al* ont rapporté, au sein d'une cohorte de 15 familles, que 25% des 41 patients CADASIL étudiés présentaient un antécédent clinique ou des signes d'infarctus du myocarde associés à des anomalies dans leur électrocardiogramme (Lesnik Oberstein, Jukema et al. 2003). Les analyses ultrastructurales du myocarde montrent la présence de lésions

caractéristiques de CADASIL, suggérant pour la 1ère fois que les patients atteints de CADASIL seraient plus susceptibles aux épisodes d'infarctus du myocarde. A l'opposé, une étude cas-témoin réalisée par Cumurciuc *et al* n'a pas relevé d'anomalies ECG de types ischémie/infarctus chez les patients CADASIL (Cumurciuc et al. 2006). Cependant, l'une des limites de cette étude était l'exclusion systématique de tous les patients présentant une démence sévère. Ainsi, on ne peut pas écarter la possibilité d'altérations du myocarde aux stades tardifs de la maladie. Plus récemment, une étude portant sur un cas de syndrome CADASIL *de novo* signale une atteinte des artères coronaires responsable de multiples épisodes de syndrome coronaire aiguë, confirmant la susceptibilité de ces patients aux maladies coronaires ou ischémiques (Rubin et al. 2015).

La mort subite constitue la 2ème cause de mortalité des patients CADASIL (soit 26%) (Opherk et al. 2004). Pour comprendre l'origine de cette forte incidence, Rufa *et al* ont analysé la variabilité du rythme cardiaque (VRC) de ces sujets (Rufa et al. 2007). Ils ont montré une réduction de tous les paramètres de VRC sans corrélation avec les lésions cérébrales de ces patients. Pour les auteurs, cette altération résulterait d'une dérégulation du système sympathique entrainant des anomalies des réponses du système sympathique autonome cardiaque impliquées dans la VRC. En 2008, Piccirillo *et al* notaient une augmentation de l'index de variabilité du QT chez des patients CADASIL, suggérant une repolarisation anormale du myocarde chez ces patients (Piccirillo et al. 2008). Ainsi, deux études indiquent une prédisposition à la survenue d'arythmies, ce qui pourrait expliquer la forte incidence de mort subite chez ces patients.

L'ensemble de ces données laisse à penser que les mutations de *NOTCH3,* responsables de CADASIL, pourraient affecter la fonction cardiaque, bien que le ou les mécanisme(s) ne soi(en)t pas encore bien défini(s).

3.3.2.2. Notch3 et hypertension artérielle pulmonaire

L'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) est définie comme une élévation soutenue de la pression artérielle supérieure à 25 mmHg au repos et 30 mmHg après effort (Gaine and Rubin 1998). Elle se caractérise par un remodelage structural des petites artères pulmonaires via la prolifération/migration des CMLV à l'origine d'un épaississement de la paroi et d'une occlusion de la lumière (Guignabert and Dorfmuller 2013). Ce remodelage est à l'origine de l'élévation des résistances vasculaires périphériques entrainant une insuffisance cardiaque droite et la mort (Hoeper, Bogaard et al. 2013).

Il est clairement établi que la voie Notch3/HES5 est impliquée dans le développement de l'HTAP chez l'Homme et chez le rongeur (Li, Zhang et al. 2009; Chida et al. 2014). Li *et al*. ont noté que l'expression de Notch3 et HES5 était augmentée dans les CLMV de patients atteints d'HTAP et dans des modèles murins d'HTAP induits par hypoxie ou injection de monocrotaline (Li, Zhang et al. 2009). De plus, l'augmentation d'expression de Notch3 est corrélée avec la sévérité de la maladie. *In vitro*, Notch3 et HES5 apparaissent comme des régulateurs clé de la prolifération et la différenciation des CMLV pulmonaires, deux processus majeurs dans la physiopathologie de l'HTAP.

4. Objectifs

Notch3, récepteur des cellules musculaires lisses, joue un rôle dans la plasticité fonctionnelle et structurelle des artères de résistance chez l'adulte. Or, il est connu que des modifications structurelles et fonctionnelles des vaisseaux de résistance modulent la survenue des effets délétères lors d'un changement hémodynamique sur les organes cible tels que le cœur et les reins.

Une précédente étude menée par l'équipe de Christos Chatziantoniou a montré qu'une invalidation du récepteur Notch3 aggravait les altérations rénales et cardiaques induites par une hypertension artérielle (Boulos, Helle et al. 2011). En effet, des souris invalidées pour *Notch3* soumises à une perfusion continue d'Angiotensine II mouraient prématurément avec un tableau d'anasarque et des signes d'insuffisance cardiaque. Cependant, les mécanismes mis en jeu n'étaient pas connus.

Les objectifs de mon projet de thèse ont été de :

- **Comprendre le rôle de la voie Notch3 dans la survenue de la cardiopathie hypertensive, et de définir si les altérations cardiaques sont directement liées à l'implication de Notch3 dans l'adaptation du myocarde et de ses vaisseaux à une surcharge de pression ou plus indirectement via l'implication de Notch3 dans le développement et/ou la maturation post natale des vaisseaux.**
- **Evaluer l'implication de la voie Notch3 dans le remodelage cardiovasculaire induit par une surcharge de débit physiologique comme l'exercice physique modéré et la gestation.**

II. Matériels

&

Méthodes

1. Modèles animaux

1.1. Souris Notch3 KO (*Notch3*$^{-/-}$)

Pour ces recherches, des souris mâles ou femelles témoins Wild Type (WT) et des souris invalidées pour le gène *Notch3* (*Notch3*$^{-/-}$) de fond génétique C57BL/6J ont été utilisées. Ces dernières ont été créées au Jackson Laboratory à Bar Harbor par le Docteur Thomas Gridley en 2003 (Krebs, Xue et al. 2003). L'invalidation par recombinaison homologue du gène d'intérêt avec une cassette de résistance à la néomycine entraîne un Knock Out total de la protéine chez les souris *Notch3* homozygotes. Ces souris sont viables et fertiles.

1.2. Oligonucléotides antisens Notch3

Des souris mâles wild-type C57BL/6J de 3 mois ont reçu une infusion d'oligonucléotides antisens *Notch3* pour réprimer l'expression de *Notch3* à l'âge adulte comme précédemment (El Machhour et al. 2015). Pour ce faire, les souris ont reçu, par mini-pompe osmotique, un cocktail de deux séquences ciblant spécifiquement le gène *Notch3* ou des séquences aléatoires (scrambled) en contrôle pendant 28 jours.

Les séquences sont composées d'oligodéoxynucléotides "phosphorothioés" pour assurer une résistance aux nucléases : N3-AS.1 (G*T*T*CGCAGGT -AGGCAA*A*G*T) et N3-AS.2 (C*C*C*CGGGCCCCCA-GCCCCATGG*C*G*G). Elles sont délivrées à la dose de 1µM par jour et comparées à l'administration de séquences aléatoires : N3-SCR.1 (C*T*A*TGCGACGTAGGAT*A*G*G) et N3-SCR.2 (C*G*C*AC-GGCCCGTGCCCGA CGCC*C*G*C).

1.3. Souris avec invalidation inductible de RBPJκ dans les CML

Enfin, un modèle de souris avec invalidation inductible du facteur de transcription *RBPJκ* a été utilisé. Ces souris sont issues du croisement de souris homozygotes hébergeant la construction *RBPJκ*$^{loxp/loxp}$ (Han et al. 2002) avec des souris mâles exprimant la construction CRE-recombinase associé au récepteur aux oestrogènes mORBP (modified oestrogen receptor binding protein). Ce dernier est localisé sur le chromosome Y sous contrôle du promoteur de la chaine lourde de la myosine musculaire lisse, SMMHC-CRE ER^{T2} (Wirth et al. 2008). Il en résulte des souris mâles SMMHC-CRE ER^{T2}, *RBPJκ*$^{loxp/loxp}$ inductibles au tamoxifène (construction, Figure 11). Ces souris sont sur un fond génétique mixte C57Bl/6J ; SV-129.

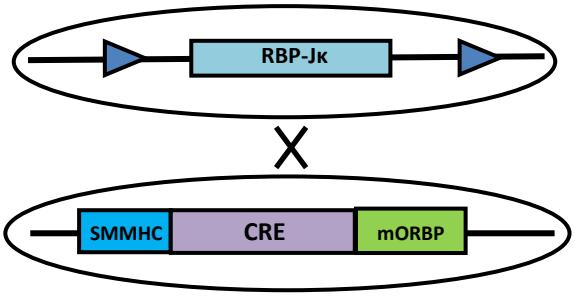


Figure 11 : Croisement des souris femelles homozygotes RBPJκ$^{loxp/loxp}$ avec des mâles SMMHC-CRE ER ^{T2} inductible par le tamoxifène.

A l'âge de 4 semaines, les souris SMMHC-CRE ER ^{T2}, *RBPJκ*$^{loxp/loxp}$ reçoivent des injections intra-péritonéales quotidiennes de 100 µL de tamoxifène (10 mg/mL dans de l'huile de tournesol stérile, Sigma-Aldrich) ou de 100 µL d'huile seule pendant 5 jours en contrôle. Toutes les souris *RBPJκ*$^{loxp/loxp}$ sont traitées au tamoxifène. Le tamoxifène entraîne, chez les souris SMMHC-CRE ER ^{T2}, une délétion du gène RBPJκ dans les cellules musculaires lisses

vasculaires (souris SM-*RBPJκ*$^{-/-}$). Les souris SMMHC-CRE ER ^{T2}, *RBPJκ*$^{loxp/loxp}$ traitées à l'huile et RBPJκ$^{loxp/loxp}$, ayant le même phénotype (poids, fonction cardiaque, expression génique cardiaque), nous les avons analysées ensemble lors de l'exploitation des données pour constituer le groupe contrôle.

1.4. Souris reportrices de l'activité recombinase de la CRE dans les CMLV

Afin de déterminer l'activité et la spécificité de la recombinase CRE dans les CMLV, nous avons croisé des souris SMMHC-CreER^{T2} avec des souris reportrices ROSA26-Stopfl-LacZ exprimant la galactosidase après délétion de la cassette floxée par la recombinase CRE. Comme les souris SMMHC-CRE ER^{T2}, *RBPJκ*$^{loxp/loxp}$, les souris sont traitées à 4 semaines au tamoxifène pendant 5 jours consécutifs puis sont sacrifiées à 15 semaines.

2. Modèles d'hypertrophie cardiaque

2.1. Hypertension artérielle par infusion d'Angiotensine II

A l'âge de 11 semaines, les souris sont soumises à une infusion d'Angiotensine II ou de sérum physiologique (1µg/kg/min) via l'implantation d'une mini-pompe osmotique (Charles River, Alzet model2004®, Figure 12), associée à un régime alimentaire riche en sel 5% pendant 28 jours.

A **B**

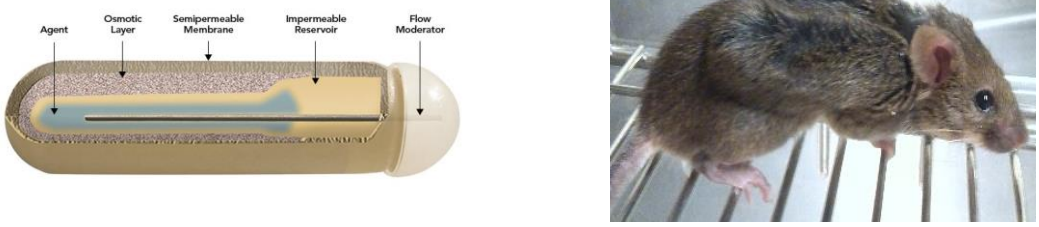


Figure 12 : Implantation des mini-pompes osmotiques. A. Schéma mini-pompe osmotique Alzet®. **B.** Souris implantée d'une mini-pompe d'Ang II

Les mini-pompes sont posées sous anesthésie générale [injection intra-péritonéale de kétamine (90mg/kg)/xylazine (5mg/kg)]. Une incision est effectuée dans la région des omoplates préalablement rasée et désinfectée à la bétadine dermique. La mini-pompe est placée en sous-cutané.

2.2. Surcharge de débit induite par un entraînement physique

Les souris WT et *Notch3*$^{-/-}$ sont soumises à un protocole d'exercice modéré sur tapis de course (Treadmill control L8 8710, Bioseb, Figure 13A) afin de reproduire, en laboratoire, une contrainte cardiaque physiologique telle que l'effort demandé lors d'une réadaptation cardiaque. Les souris sont placées en cycle jour/nuit inversé pour s'adapter aux contraintes de l'exercice physique en phase éveillée. Le protocole comporte une semaine d'acclimatation dans le couloir de course suivie de 5 semaines d'exercice d'intensité progressivement croissante en durée et/ou en vitesse (Figure 13B).

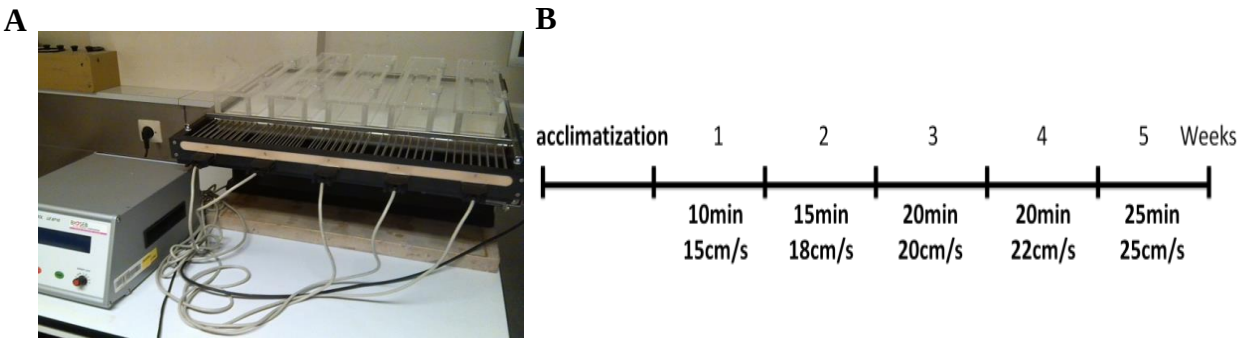


Figure 13 : Protocole d'exercice physique sur tapis. A. Tapis d'exercice utilisé pour le protocole. **B.** Protocole d'exercice mis en place.

La stimulation de la course se fait à l'aide d'un système de grilles, positionnés à l'arrière du tapis, qui déchargent des stimuli électriques (0,4 mA). En cas d'incapacité à l'exercice (5sec sur la grille), la souris est retirée du couloir en cours de protocole. L'analyse de la distance et du nombre de stimuli reçus pour chaque souris est déterminée à l'aide du logiciel Sedacom32.

2.3. Surcharge de débit induite par la gestation

Des souris femelles WT ou *Notch3*$^{-/-}$ ont été utilisées pour définir le phénotype cardiaque à l'état de base et lors de l'adaptation cardiaque à une gestation. Pour cela, les souris ont été accouplées avec des mâles hétérozygotes à l'âge de 3 mois et ont été sacrifiées dans les 24h après la mise-bas.

3. Evaluations fonctionnelles

3.1. Mesure de la pression artérielle

La pression artérielle des souris a été mesurée de manière non invasive par pléthysmographie avec l'appareil Coda system (Kent Scientific Corporation, USA). On obtient ainsi les valeurs de pression artérielle systolique et diastolique. Pour optimiser les mesures, les souris sont entrainées durant 15 jours avant la mise en place des mini-pompes. Une fois les mini-pompes implantées, la pression artérielle est mesurée 2 fois par semaine. Au total, 10 mesures seront prises pour chaque animal par jour.

3.2. Echocardiographie

Un échocardiogramme des souris a été réalisé à l'état basal et durant les différents protocoles par les Drs Mathilde Baudet, Astrid Monfort, Medhi Meddour, Najla Akrout et Sabine Guinemer. L'échographie transthoracique a été réalisée à l'aide d'un appareil ACUSON S3000 (Siemens healthcare, Germany) équipé d'un capteur linéaire de 14 MHz. Pour ce faire, les souris ont été rasées et anesthésiées par isoflurane (Aérane®, Baxter) 1% pour l'induction puis entre 0,2 et 0,5% en dose d'entretien.

Les paramètres mesurés sont : les diamètres télédiastolique et télésystolique du ventricule gauche (DTSVG, DTDVG), l'épaisseur des parois septale et postérieure, la fraction de raccourcissement, le diamètre de la valve pulmonaire, la vitesse moyenne dans l'artère pulmonaire et la fréquence cardiaque, permettant le calcul du débit cardiaque.

4. Mise à mort des souris et prélèvement des organes

A l'issu des différents protocoles, les souris sont tuées par injection de phénobarbital (50mg/kg) suivie d'une injection intra-cardiaque de KCl (1M). Les données anatomiques sont enregistrées : poids de l'animal, du cœur, des poumons, du foie, du rein gauche, de l'utérus pour les femelles, ainsi que la longueur du tibia. Les oreillettes sont séparées des ventricules puis congelées dans un cryotube dans l'azote liquide afin de les conserver à -80°C. La base du cœur est montée sur un liège dans l'OCT, alors que la partie inférieure des ventricules est découpée, mise dans un cryotube et congelée dans l'azote liquide puis conservée à -80°C .

5. Analyses quantitatives et qualitatives

5.1. Extraction des ARN totaux et réverse transcription

Les ARN totaux sont extraits à partir de 10mg de cœur avec le kit QIAGEN RNeasy Mini Kit. Il s'agit d'une extraction sur colonne d'affinité qui va retenir les acides ribonucléiques. Pendant l'extraction, les échantillons sont traités avec de la DNase afin d'éviter toute contamination avec de l'ADN génomique. La concentration et la qualité des ARN sont déterminées à l'aide du spectrophotomètre ND-100 (Nanodrop). Les ARN sont considérés de bonne qualité si le ratio 260/280 nm est compris entre 1,9 et 2,1.

La synthèse d'ADNc est effectuée à l'aide du Kit QuantiTect® Reverse Transcription Handbook (Qiagen) à partir de 500 ng d'ARN total dans un mélange réactionnel composé de tampon Quantiscript RT, d'un mix primer RT 5x (oligo-dT + amorces aléatoires) et de la transcriptase reverse Quantiscript. L'ADNc, ainsi obtenu, est conservé à -20°C et dilué au 1/50ème pour la PCR quantitative.

5.2. RT-PCR quantitative

Les RT-PCR quantitatives en temps réel sont réalisées à partir de 1,25 ng d'ADNc et de 10 µmoles d'amorces spécifiques permettant l'amplification des gènes d'intérêt à l'aide du thermocycleur Realplex (Eppendorf) ou LightCycler® 96 (Roche).

La quantité d'ADNc spécifique d'un gène donné est calculée relativement à un échantillon choisi comme référence (le calibrateur) après normalisation par rapport à la quantité d'ADNc spécifique d'un gène de référence dit « de ménage » (la Glycéraldéhyde 3-Phosphate Déshydrogénase, GAPDH dans notre cas). Le calibrateur est composé d'un pool d'ADNc de cœurs sains et pathologiques. La formule utilisée est : $2^{-\Delta\Delta CT}$ où : $\Delta\Delta C_T = [C_T(\text{gène d'intérêt}) - C_T(\text{GAPDH})]_{\text{échantillon}} - [C_T(\text{gène d'intérêt}) - C_T(\text{GAPDH})]_{\text{calibrateur}}$

Table 3 : Amorces utilisées pour les PCR quantitatives

Gene	Séquences d'amorce sens (5'-3')	Séquences d'amorces antisens (5'-3')
Acta2	CTGACAGAGGCACCACTGAA	CTACTCCAGAGTCCAGCACA
Cd68	TTC TGC TGT GGA AAT GCA AG	AGAGGGGCTGGTAGGTTGAT
Col1a1	GCAGGTTCACCTACTCTGTCCT	CTTGCCCCATTCATTTGTCT
Col3a3	TCCCCTGGAATCTGTGAATC	TGAGTCGAATTGGGGAGAAT
Ctgf	CAAAGCAGCTGCAAATACCA	GGCCAAATGTGTCTTCCAGT
Dll4	CCTCTCGAACTTGGACTTGC	AGCTCCTGCTTAATGCCAAA
Flk1	CGCGGTGGTGACAGTATCTT	GCCAACACCCTGTGCAAGTCC
Flt1	GGCATCCCTCGGCCAACAATC	AGTTGCTGCTGGGATCCAGG
sFlt1	ATGCGCTGCAGAGCCAGGAAC	GGTACAATCATTCCTCCTGC
Fn	ACTGACGAAGAGCCCTTAC	AGATAACCGCTCCCATTCC
Gapdh	AACTTTGGCATTGTGGAAGG	ACACATTGGGGGTAGGAACA
Nox2	ACTGCGGAGAGTTTGGAAGA	GGTGATGACCACCTTTTGCT
Hes1	CCCACCTCTCTCTTCTGACG	AGGCGCAATCCAATATGAAC
Hes5	GCATCAACAGCAGCATAGAGCA	AGGTAGCTGAGACGGCCATCTC
Hey1	CTTTGATGGACCGAGGTGTT	TCCCTTCACCTCACTGCTCT
Hey2	TTCTGTCTCTTTCGGCCACT	TTTGTCCCAGTGCTTGTCTG
Heyl	CACTCCCTGAAGACGAAAGC	GCTCGTATGTCTGGTGCTGA
Lgals3	CAGTGCTCCTGGAGGCTATC	ATTGAAGCGGGGGTTAAAGT
Myh7	TGCAAAGGCTCCAGGTCTGAGTCT	GCCAACACCAACCTGTGCAAGTTC
Nos3	TATAGCCCGCATAGCGTATC	AAGCTGCAGGTATTTGATGC
Notch1	TGAGACTGCCAAAGTGTTGC	GTGGGAGACAGAGTGGGTGT
Notch2	CCTGAACGGGCAGTACATTT	GCGTAGCCCTTCAGACACT
Notch3	AGCTGGGTCCTGAGGTGAT	AGACAGAGCCGGTTGTCAAT
Nppa	CCTAAGCCCTTGTGGTGTGT	CAGAGTGGGAGAGGCAAGAC
Nppb	CAGCTCTTGAAGGACCAAGG	AGACCCAGGCAGAGTCAGAA
Rcan1	AGGTCCCTGTCATGCTTCTG	TCTGGACCCATTCCTTCTTG
Vefga	AAAGTGCTCCTCGAAGAGTCTCC	CCTTAATCCAGAAAGCCTGACATG

6. Histologie

L'histologie et l'immunohistologie sont réalisées sur des coupes transversales de cœur. Ces coupes sont faites au cryostat, mesurent 7 µm d'épaisseur et sont stockées à -80°C.

6.1. Marquages fluorescents

Les marquages fluorescents sont réalisés à partir de coupes transversales de ventricules au cryostat. Après saturation des sites non-spécifiques par l'albumine bovine (BSA) 5% dans du PBS pendant 30 min, les lames sont incubées 1 h30 à température ambiante avec les anticorps suivants : lapin anti-Notch3 (1/200, Abcam), souris anti-α-actine de muscle lisse (ACTA2) (1/500), souris anti-vinculine (1/250, Sigma-Aldrich), lapin anti-caveoline-1 (1/200, Sigma-Aldrich), souris anti- ectodomaine A de la fibronectine cellulaire (FN-EDA) (1/100, Sigma-Aldrich), lapin anti-cleaved caspase 3 clivée (1/100, Cell Signaling), rat anti-CD68 (1/200, AbD Serotec) puis avec des anticorps secondaires couplés à un fluorochrome (Alexa fluor-488 ou -594, 1/250e, Invitrogen). Pour détecter l'actine polymérisée (actine F) et la production d'anion superoxyde, les lames sont incubées respectivement avec la phalloïdine couplée au FITC (0,33µL/L, Sigma) et le dihydroéthidium (37µmol/L, Sigma) pendant 30min. Enfin, un milieu de montage (Vectashield) contenant du DAPI est rajouté afin de mettre en évidence les noyaux des cellules. Les coupes sont observées au microscope à lumière fluorescente au grossissement x20 (Leica).

Le remodelage de la coronaire est déterminé à partir des coupes marquées à l'anticorps anti-ACTA2 (vaisseaux de diamètre >20µm) en mesurant le rapport media/lumière.

La densité artériolaire est déterminée à partir de séries d'images acquises au grossissement x10 (8-11 images par lame). Le nombre d'artérioles marquées à l'α-actine de muscle lisse (SM-α-actine) est mesuré pour chaque image et moyenné par animal.

La densité capillaire est définie comme le rapport du nombre de capillaires par cardiomyocyte.

L'analyse quantitative est effectuée à l'aide du logiciel IPlab. La production de ROS est déterminée par le pourcentage de marquage au DHE dans la zone d'intérêt. La densité capillaire est déterminée après marquage cavéoline-1/vinculine qui détecte respectivement les capillaires et les myocyte. Le nombre de cellules marquées à la caveoline-1 par rapport au nombre de cellules marquées à la vinculine (cardiomyocytes) par image permet de calculer la proportion relative capillaires/myocyte.

6.2. Estimation de la fibrose par coloration au rouge Sirius

Des coupes de ventricules sont séchées à température ambiante. Après réhydratation par des bains d'alcool décroissant (2min dans l'alcool 100%, puis alcool 50%) puis 3 bains d'H_2O, les lames sont incubées dans le rouge Sirius pendant 1 h. Les coupes sont ensuite rincées dans l'acide acétique 0,5% puis déshydratées avec 2 bains d'alcool 95%, 2 min, un bain d'alcool 100%, 2 min puis 2 bains de xylène, 3 min et montées en Eukit. Les coupes sont ensuite observées en lumière polarisée. La fibrose est déterminée par le pourcentage de fibres de collagènes dans la zone d'intérêt.

6.3. Localisation de l'activité de la CRE par marquage à la ß-Galactosidase et coloration hématoxyline-éosine.

Les cœurs, fixés dans le paraformaldéhyde 4%, sont incubés avec une solution de coloration contenant du X-Gal (β-Gal Staining Kit, invitrogen) afin de révéler l'activité ß-Galactosidase dans les CMLV. Après 24h d'incubation, les cœurs sont coupés transversalement et inclus en paraffine. Des coupes de 5µm sont alors réalisées au microtome.

Pour déterminer les différentes structures cellulaires, les coupes de cœurs marquées à la X-Gal sont colorées à l'Hématoxyline-Eosine. Après déparaffinage des coupes au xylène puis hydratation par des bains d'alcool décroissants (5 min dans de l'alcool 100%, 90%, 70% puis H2O), elles sont colorées à l'Hématoxyline de Mayer (Sigma-Aldrich) pendant 5min et à l'Eosine alcoolique (Labonord) pendant 10 min. Les coupes sont ensuite déshydratées par des bains d'alcool croissants (10 min dans de l'alcool 70%, 90% puis 3 fois 100%), incubées dans du toluène 1 min et sont montées en Eukit.

7. Quantification protéique par western blot

7.1. Extractions protéiques

Les protéines sont extraites à partir de morceaux d'apex ou de blocs de cœurs broyés dans un tampon de lyse RIPA (50mM Tris HCl pH7.4, 1mM EDTA, 150 mM NaCl) en présence d'anti-protéases et d'anti-phosphatases. Le tampon de lyse contenant 1% de Na Deoxycholate ou 1% de Triton est utilisé pour détecter le VEGFR2 et les protéines oxydées, respectivement.

Après centrifugation (12000 rpm, 10 min, +4°C), la concentration des protéines solubles est mesurée par spectrophotométrie à l'aide du kit Pierce BCA Protein Assay (ThermoFischer Scientific, France).

7.2. Western Blot

Les échantillons dilués dans le tampon d'extraction (20µg) et le tampon de charge sont chauffés à 99 °C pendant 7 min pour dénaturation. Les protéines sont séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide SDS-page 4-20% (Biorad), transférées sur membrane de nitrocellulose (0,45 µm), puis colorées au rouge ponceau. Les sites non spécifiques des membranes sont saturés à l'aide d'une solution de Blocking Buffer (Sigma-Aldrich).

Les membranes sont incubées avec les anticorps primaires suivants : anticorps souris anti-galectine 3 (1/1000, Thermo Fischer Scientific), lapin anti-VEGFA (1/2000, Millipore), lapin anti-VEGFR2 (1/1000, Cell signaling), ou lapin anti-Notch3 (1/1000, Abcam) la nuit à 4°C. Les blots sont ensuite incubés avec des IgG de mouton anti-souris (1/5000; GE Healthcare) oui de chèvre anti-lapin (1/5000, Sigma-Aldrich, France) couplés à la peroxydase 1 h à 20°C avant de révéler l'activité peroxydase avec ECL Prime (GE Healthcare). La GAPDH a été pris comme contrôle de charge. La Chimiluminescence est détectée en utilisant le LAS 3000 (Fuji) ou l'AZURE (Azure Biosystems) et mesurée par le logiciel MultiGauge V2.02 software (Fuji).

8. Analyses statistiques

Les données sont exprimées en moyenne ± l'erreur standard de la moyenne. La comparaison entre les différents groupes est effectuée par un test de variance ANOVA 2 voies suivi d'une analyse multivariée avec correction de Bonferroni ou Sidak. Une valeur $p<0,05$ entre deux groupes est considérée comme statistiquement significative. Pour la comparaison des groupes SM-*RBPJκ*$^{-/-}$ sacrifiés à J8, un test non paramétrique de Mann Whitney a été utilisé. Une valeur de $p<0.05$ était considérée comme statistiquement significative.

III. Résultats

1. Chapitre 1: L'invalidation de la voie Notch3 dans les CMLV favorise l'insuffisance cardiaque en réponse à l'HTA

Ragot et al, Hypertension, août 2016

1.1. Introduction

L'insuffisance cardiaque demeure un problème majeur de santé publique. L'hypertension artérielle (HTA) constitue l'une des principales causes d'insuffisance cardiaque, touchant environ 20% de la population adulte. Elle est à l'origine d'un remodelage vasculaire qui touche aussi bien macrocirculation que la microcirculation et participe aux effets délétères de l'HTA (Schiffrin 2012). Cependant, de nombreuses voies de signalisation, notamment impliquées dans les cellules musculaires lisses de ces artères, sont encore méconnues.

Des études ont montré que Notch3 avait un rôle clé dans la physiologie des petites artères de résistance (Belin de Chantemele, Retailleau et al. 2008) en contrôlant la maturation post-natale des cellules musculaires lisses (Domenga, Fardoux et al. 2004) et le tonus myogénique (Belin de Chantemele, Retailleau et al. 2008). L'invalidation de *Notch3* aggraverait les altérations rénales et cardiaques induites par une hypertension artérielle (Boulos, Helle et al. 2011), bien que les mécanismes à l'origine n'aient pas été mis en évidence.

Les étapes du projet visaient à mieux comprendre le rôle de la voie Notch3 dans la survenue de la cardiopathie en réponse à l'hypertension artérielle.

Pour mener à bien ces objectifs, 3 modèles de souris avec répression de la voie Notch3 ont été utilisés : 1- invalidation congéniale de *Notch3*, 2- invalidation induite à l'âge adulte par délétion du gène *RBPJκ* dans les CML par traitement au tamoxifène et 3- par infusion d'oligonucléotides antisens de *Notch3*. Ces souris ont été implantées d'une mini-pompe d'Ang II à 3 mois pendant 28 jours (1µg/kg/min) associée à un régime salé 5%, comme décrit précédemment (Boulos, Helle et al. 2011).

1.2. Résultats et discussion

1.2.1. L'invalidation de la voie de Notch3 dans les CML induit une insuffisance cardiaque en réponse à l'HTA

A l'état basal, les souris *Notch3*$^{-/-}$ présentent une hypertrophie cardiaque sans altération de la fonction cardiaque (Table 1). En réponse à l'infusion d'Ang II, les souris *Notch3*$^{-/-}$ développent une HTA moindre que les souris WT, mais montrent une dilatation ventriculaire associée à une diminution de la fraction de raccourcissement (FR), indiquant une dysfonction systolique. Ces résultats sont en accord avec les premières observations réalisées par Boulos *et al* (Boulos, Helle et al. 2011). Nous avons cherché à savoir si cette altération résultait d'un rôle de la voie Notch3 dans l'adaptation cardiovasculaire à l'HTA ou si elle était secondaire à un défaut développemental.

Pour cela, nous avons utilisé des souris avec délétion inductible de *RBPJκ*, le facteur de transcription de Notch, dans les CML. Une précédente étude menée par l'équipe d'Anne Joutel avait montré que la délétion de *RBPJκ* en post-natal phénocopiait les altérations cérébrales observées chez les souris *Notch3*$^{-/-}$ (Fouillade et al. 2013). Au cours de cette étude, nous voulions éviter l'effet de Notch3 au cours du développement et de la maturation des CML qui a lieu durant les 4 premières semaines chez la souris. C'est pourquoi, nous avons choisi d'invalider ce gène à l'âge de 4 semaines à la suite du sevrage (SM-*RBPJκ*$^{-/-}$).

Contrairement aux souris *Notch3*$^{-/-}$, les souris SM-*RBPJκ*$^{-/-}$ n'ont pas d'hypertrophie cardiaque à l'âge adulte (Table 2). Néanmoins, l'HTA induite par l'Ang II conduit également à une dilatation ventriculaire et à une altération importante de la FR, ce qui indique que l'activité de la voie Notch3/RBPJκ dans les CMLV est nécessaire pour l'adaptation du cœur à une HTA.

1.2.2. L'invalidation de la voie de Notch3 dans les CML altère l'adaptation de la macro et de la microcirculation à l'HTA.

Notch3, étant exprimé dans les CMLV, nous nous sommes focalisés sur le compartiment vasculaire. Nous montrons que l'absence de la voie Notch3 conduit à un manque d'hypertrophie de la média associé à un phénotype sécrétoire majoré des CMLV en réponse à l'HTA (diminution de l'Actine-F et de l'α actine de muscle lisse et augmentation de la Fibronectine-EDA) (Figure 1). Cette altération se retrouve également chez des souris WT recevant une perfusion d'oligonucléotides antisens *Notch3* associée à l'Ang II (Figure S4), confirmant le rôle déterminant de Notch3 dans ce processus. De précédentes études avaient montré un rôle de Notch3 dans le contrôle du phénotype et de l'hyperplasie des CMLV induit par l'HTA pulmonaire (Li, Zhang et al. 2009). Dans ce contexte, nous ne trouvons pas de cellules en prolifération, comme le témoigne l'absence d'immunomarquage KI67 dans les artères (Figure S2). Ce résultat suggère que l'hypertrophie de la média, observée chez les souris WT+angII résulterait, d'une hypertrophie des CMLV où Notch3 serait impliqué.

Au niveau de la microcirculation, nous notons une altération à l'état basal de la densité artériolaire dans les deux modèles de souris qui ne semble pas s'accentuer par l'HTA (Figure 3). Ces résultats nous indiquent que la raréfaction artériolaire, également observée chez les souris *Notch3*$^{-/-}$ dans d'autres études (Liu, Zhang et al. 2010), ne serait pas seulement secondaire à un défaut développemental, mais serait liée à un rôle de la voie Notch3/RBPJκ dans le maintien de l'intégrité coronaire à l'âge adulte. Par ailleurs, la densité capillaire, similaire aux contrôles à l'état basal, est moindre après 28 jours d'infusion d'Ang II et concomitant avec une faible expression de la voie angiogénique du VEGFA/VEGFR2 (Figure 2 et Table S2). Ces résultats montrent ainsi l'importance de la voie Notch3 dans le remodelage vasculaire induit par l'HTA.

1.2.3. L'invalidation de la voie de Notch3 dans les CML conduit à un remodelage cardiaque délétère induit par l'HTA

Il est connu qu'une altération de la microcirculation conduit à un déséquilibre de la balance besoin/apport nécessaire au cardiomyocyte, ce qui en résulte un remodelage cardiaque délétère impliquant la fibrose, l'inflammation et le stress oxydant (cf. section I 2.3.).

Nous montrons que les souris *Notch3*$^{-/-}$ et SM-*RBPJκ*$^{-/-}$ présentent l'état basal une production à d'anion superoxyde plus importante, comme le témoigne le marquage au Dihydroéthidium (DHE, Figure 3). En réponse à l'HTA, nous notons une exacerbation du marquage au DHE chez les SM-*RBPJκ*$^{-/-}$ et une oxydation des protéines, déterminée par oxyblot, chez les souris *Notch3*$^{-/-}$, indiquant un niveau de stress oxydant plus important chez ces souris. En revanche, nous observons une fibrose et une infiltration macrophagique chez les souris *Notch3*$^{-/-}$ hypertendues qui ne se retrouvent pas chez les souris SM-*RBPJκ*$^{-/-}$. Ces données suggèrent que la fibrose et l'inflammation seraient la conséquence de l'invalidation à long terme de Notch3, alors que le stress oxydant est directement lié à l'absence de la voie Notch3/RBPJκ à l'âge adulte.

1.2.4. La décompensation cardiaque secondaire l'invalidation de la voie Notch3 est associée avec une altération des voies angiogéniques.

Comme observé par Boulos *et al*, nous notons un taux de mortalité important chez les souris *Notch3*$^{-/-}$, ainsi que chez les souris SM-*RBPJκ*$^{-/-}$. Bien que certaines souris mouraient de causes non déterminées, 81,2% des souris *Notch3*$^{-/-}$+angII et 53,8% des souris SM-*RBPJκ*$^{-/-}$ +angII décédaient à la suite d'une décompensation cardiaque (ADHF) entre les jours 6 et 8 d'infusion d'Ang II. Pour évaluer le rôle de la voie Notch3 dans ce processus aiguë, nous

avons choisi de sacrifier les souris qui présentaient des signes cliniques de décompensation (anasarque, dyspnée ou signes de points limites) entre les jours 6 et 8, ainsi que des souris contrôles ou SM-*RBPJκ*$^{-/-}$ sans atteintes visibles à 8 jours.

Alors que toutes les souris SM-*RBPJκ*$^{-/-}$ ont une dilatation ventriculaire et une diminution de la FR, seules les souris avec ADHF montrent un effondrement du débit cardiaque et une congestion pulmonaire associée avec une induction des marqueurs du remodelage cardiaque délétère impliqués dans la fibrose, l'inflammation et le stress oxydant (Figure 4 et Table S3). Par ailleurs, les analyses moléculaires et protéiques révèlent chez ces souris une diminution de l'expression des composants de la voie angiogénique du VEGFA/VEGFR2.

1.3. Conclusions

L'ensemble de ce travail démontre que la voie de signalisation Notch3/RBPJκ est nécessaire au maintien de l'intégrité de l'arbre coronaire, via une régulation de la voie VEGFA/VEGFR2, en réponse à une surcharge de pression. Par ailleurs, nous montrons que ce maintien d'intégrité, médié par la voie Notch3/RBPJκ, est essentiel pour l'adaptation cardiaque dans un contexte d'hypertension artérielle. Or, aujourd'hui plusieurs études ont montré que Notch3 pouvait avoir un rôle délétère en modulant la prolifération cellulaire dans le développement de l'HTAP (Li, Zhang et al. 2009), de maladies rénales (El Machhour, Keuylian et al. 2015), ou de cancers (Dang, Gazdar et al. 2000; Park, Li et al. 2006; Ozawa, Kazama et al. 2014), faisant de Notch3 une thérapeutique potentielle. Nos données soulèvent ainsi la question quant aux effets secondaires que pourrait avoir la répression de la voie Notch3 sur le système cardiovasculaire en cas de traitement ciblant le récepteur.

1.4. Article original

Loss of Notch3 Signaling in Vascular Smooth Muscle Cells Promotes Severe Heart Failure Upon Hypertension

Hélène Ragot, Astrid Monfort, Mathilde Baudet, Fériel Azibani, Loubina Fazal, Régine Merval, Evelyne Polidano, Alain Cohen-Solal, Claude Delcayre, Nicolas Vodovar, Christos Chatziantoniou,* Jane-Lise Samuel*

Abstract—Hypertension, which is a risk factor of heart failure, provokes adaptive changes at the vasculature and cardiac levels. Notch3 signaling plays an important role in resistance arteries by controlling the maturation of vascular smooth muscle cells. *Notch3* deletion is protective in pulmonary hypertension while deleterious in arterial hypertension. Although this latter phenotype was attributed to renal and cardiac alterations, the underlying mechanisms remained unknown. To investigate the role of Notch3 signaling in the cardiac adaptation to hypertension, we used mice with either constitutive *Notch3* or smooth muscle cell–specific conditional *RBPJκ* knockout. At baseline, both genotypes exhibited a cardiac arteriolar rarefaction associated with oxidative stress. In response to angiotensin II–induced hypertension, the heart of *Notch3* knockout and SM-*RBPJκ* knockout mice did not adapt to pressure overload and developed heart failure, which could lead to an early and fatal acute decompensation of heart failure. This cardiac maladaptation was characterized by an absence of media hypertrophy of the media arteries, the transition of smooth muscle cells toward a synthetic phenotype, and an alteration of angiogenic pathways. A subset of mice exhibited an early fatal acute decompensated heart failure, in which the same alterations were observed, although in a more rapid timeframe. Altogether, these observations indicate that Notch3 plays a major role in coronary adaptation to pressure overload. These data also show that the hypertrophy of coronary arterial media on pressure overload is mandatory to initially maintain a normal cardiac function and is regulated by the Notch3/RBPJκ pathway. (***Hypertension*. 2016;68:392-400. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.116.07694.**)
• **Online Data Supplement**

Key Words: coronary artery ■ heart failure ■ hypertension ■ Notch3 signaling ■ smooth muscle cells ■ vasculature

Heart failure (HF) is a leading cause of mortality worldwide. HF is defined as the inability of the heart to provide sufficient blood flow to the rest of the organism. The contractile dysfunction observed in HF can be due to either an intrinsic alteration of cardiomyocyte function (eg, alteration of calcium homeostasis or contractile proteins, etc) or to modifications of the microenvironment that limits the input in oxygen and nutrients to cardiomyocytes.[1]

Hypertension is a major risk factor for the development of HF. During the course of hypertension, the cardiac hypertrophy and later cardiac fibrosis develop to adapt to pressure overload.[2] In parallel, the media of the artery also hypertrophies to face the increase in pressure and perivascular fibrisos develops, which also contributes to the sustainment of hypertension.[3,4] The cardiac vasculature plays a major role in hypertension because it needs to adapt to maintain sufficient metabolic input to cardiomyocytes. Consequently, the discoordination between cardiomyocyte hypertrophy and angiogenesis contributes to the progression from adaptive cardiac hypertrophy to HF.[5]

However, structural alteration of cardiac microvasculature is not specific to hypertension because microvascular rarefaction and decrease in coronary reserve are commonly associated with idiopathic cardiomyopathies.[6,7] However, the kinetics of cardiac microvasculature rarefaction, hence its role in the establishment and progression of HF, remains unclear.

Notch receptors are evolutionarily conserved membrane-tethered transcription factors that regulate cell–cell interactions and mediate cell fate decisions.[8] In mammals, Notch signaling is initiated by the binding of ligand of the Jagged/Delta-like family to the Notch receptors, which undergo sequential proteolytic cleavages, leading to the nuclear translocation of the Notch intracellular domain. Once in the nucleus, the Notch intracellular domain converts the

Received April 18, 2016; first decision May 2, 2016; revision accepted May 10, 2016.

From the Inserm UMR-S 942 and Paris Diderot University, Paris, France (H.R., A.M., M.B., F.A., L.F., R.M., E.P., A.C.-S., C.D., N.V., J.-L.S.); Department of Cardiology, Lariboisière Hospital, Paris, France (A.C.-S.); and Inserm UMR-S 1155 and Pierre and Marie Curie University, Paris, France (C.C.).

*These authors contributed equally to this work.

The online-only Data Supplement is available with this article at http://hyper.ahajournals.org/lookup/suppl/doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.116.07694/-/DC1.

Correspondence to Jane-Lise Samuel, Inserm UMR-S 942, Hôpital Lariboisière, 41 Boulevard de la Chapelle, 75475 Paris Cedex 10, France. E-mail jane-lise.samuel@inserm.fr

© 2016 American Heart Association, Inc.

Hypertension **is available at http://hyper.ahajournals.org** **DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.116.07694**

Downloaded from http://hyper.ahajournals.org/ at INSERM - DISC on July 14, 2016

transcriptional repressor recombination signal–binding protein immunoglobulin κ-J region (RBPJκ) into a transcriptional activator[9] and initiates the transcription of Notch target genes, most of which belong to the hairy enhancer of split (*HES*) and hairy enhancer of split-related (*HEY*) gene families. Of note, it has been proposed an alternative noncanonical Notch signaling pathway, whereby Notch intracellular domain transcriptional activity is not mediated through RBPJκ but through the association with other transcriptional regulators. Of the 4 Notch receptors present in mammals, Notch3 is predominantly expressed in the vascular smooth muscle cells (VSMCs) of distal arteries in postnatal period,[10] where it plays a role in the differentiation and maturation of small arterial vessels.[9,10] Consequently, Notch3 was shown to be involved in the vascular tone of cerebral, tail,[11] and kidney[12] arteries in mouse. In human, dominant-negative mutations of *NOTCH3* are responsible for cerebral arteriopathy known as Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarctions and Leukoencephalopathy (CADASIL[13]) that leads to dementia and death, although a recent work also reported alterations of the coronary microvasculature.[14] Although *NOTCH3* loss of function does not lead to CADASIL,[15] it was recently shown to be involved in the context of monocrotaline-induced pulmonary[16] and angiotensin II (angII)–induced systemic hypertension,[12] although with opposite outcome: in the former loss of Notch3 signaling was protective, while in the latter it was associated with a higher mortality that was attributed to renal and cardiac alterations through an unknown mechanism.

In this study, we investigated the impact of the congenital or conditional loss of Notch3 signaling on cardiac adaptation to hypertension. Results clearly show that the absence of Notch3-RBPJκ pathway in VSMCs led to the development of HF in response to pressure overload, with alterations of the cardiac vasculature being a direct causal factor.

Materials and Methods

Materials and Methods are described in detail in the online-only Data Supplement.

Experimental Design

Experimentations were conducted in agreement with the standards of animal care (National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals). Animal work was approved by the French National Committee of Ethic Reflexion on Animal Experimentation (CNREEA number, 09; 2010-12-01 and 2014-10-03). Animals were bred in the local animal facility with free access to water and food.

Three- to 4-month-old male mice with *Notch3* deletion (*Notch3*$^{-/-}$) in a C57Bl/6J background,[17] *RBPJκ*$^{flox/flox}$, SM-myosin heavy chain-CreERT2 on a mixed C57BL/6J x 129/sv strain, and respective littermate controls were used. SM-*RBPJκ*$^{-/-}$ animals were generated by mating mice harboring a conditional allele of *RBPJκ* (*RBPJκ*^{flox})[18] with a tamoxifen-inducible CreER driver mouse line SM-myosin heavy chain-CreERT2,[19] which expresses the CreER recombinase under the control of the VSMC-specific SM-myosin heavy chain promoter. The excision was induced at postnatal week 4 by intraperitoneal injection of tamoxifen (1 mg/d for 5 days) or vehicle (oil) as controls.

AngII–Induced Hypertension Model

After ketamine (90 mg/kg)–xylazin (5 mg/kg) anesthesia, mice were implanted subcutaneously with osmotic mini-pumps (Model 2004, Alzet, Charles River, France) that delivered 1 μg/kg per minute of angII (Sigma Aldrich, France) or saline solution for 4 weeks. Animals were fed with a 5% salt diet as previously described.[12]

Statistical Analysis

Analyses were performed using the Prism 6 software. Results are expressed as mean±SEM or fold increase, as appropriate. Genotype–phenotype interactions were studied by 2-way analysis of variance. Multiple comparisons were performed with 1-way analysis of variance followed by post hoc test with Bonferroni correction. Categorical data were analyzed using exact χ^2 test. A $P<0.05$ was considered statistically significant.

Results

VSMC Impairment in Notch3 Signaling Promotes HF Secondary to Hypertension

At baseline, *Notch3*$^{-/-}$ mice exhibited a cardiac hypertrophy (heart weight/tibia length) when compared with wild-type (WT) animals ($P<0.0001$), although echocardiographic parameters and systolic blood pressure were similar (Table 1). After 4 weeks of angII infusion, WT exhibited the typical symptoms of hypertension: elevated blood pressure and cardiac hypertrophy with preserved fractional shortening. Of note, few WT animals died because of aortic dissection or aneurysm rupture, commonly observed in C57Bl/6J genetic background.[20,21] *Notch3*$^{-/-}$ mice also had hypertension but at lesser extent than WT animals (Table 1; $P<0.001$). In marked contrast, *Notch3*$^{-/-}$+angII mice exhibited an exacerbated cardiac hypertrophy (+28% versus *Notch3*$^{-/-}$), which was higher than in WT+angII animals (+30%; $P<0.001$), a cardiac dilatation, and a rapid and sustained decrease in fractional shortening (Table 1). Together with the increase in cardiac stress markers (Table S2 in the online-only Data Supplement), these data indicate that *Notch3*$^{-/-}$ mice developed HF with systolic dysfunction, in response to hypertension. Of note, mortality was earlier and higher in *Notch3*$^{-/-}$+angII mice than in WT+angII animals, as already observed,[12] and was not associated with aortic dissection or aneurysm rupture as in WT mice.

To rule out this phenotype as a result of developmental defect, we tested the conditional invalidation of Notch3 signaling in adult mice. Because *Notch3* conditional allele is not available, we therefore selectively deleted the *RBPJκ* gene specifically in the VSMCs in adult mice,[22] SM-*RBPJκ*$^{-/-}$ (Figure S1). At baseline, SM-*RBPJκ*$^{-/-}$ mice did not exhibit any cardiac hypertrophy contrary to *Notch3*$^{-/-}$ animals. After receiving angII for 4 weeks, SM-*RBPJκ*$^{-/-}$ phenocopied *Notch3*$^{-/-}$ animals, that is, decrease in fractional shortening, cardiac dilatation, although blood pressure was similar to controls (Table 2). Taken together, these data strongly suggest that baseline cardiac hypertrophy in *Notch3*$^{-/-}$ results in part from the long-term loss of Notch3 signaling or from a role of Notch3 during development and that the short-term loss of Notch3 signaling in VSMCs in adult is sufficient to promote HF secondary to angII-induced hypertension.

Impairment in Notch3 Signaling Promotes Vascular Rarefaction at Baseline and Upon Hypertension

Because Notch3 signaling is required in VSMCs, we next investigated the coronary vasculature. At baseline, coronary

Downloaded from http://hyper.ahajournals.org/ at INSERM - DISC on July 14, 2016

Table 1. Biological and Cardiac Functional Data of WT and Notch3$^{-/-}$ Mice After 28 Days of Angiotensin II Infusion

	Day	Groups			
		WT	*Notch3*$^{-/-}$	WT+angII	*Notch3*$^{-/-}$+angII
n		31	21	32	30
SBP, mmHg	8	117±2	121±3	178±10*	156±6*†
SBP, mmHg	28	123±3	126±7	188±3*	153±8*†‡
Mortality rate, %	8	0	0	6	37§
Mortality rate, %	28	0	0	19	57§
Echocardiography					
FS, %	6	31.2±0.7	32.3±1.8	35.7±1.9	27.4±1.1*†‡
FS, %	25	33.7±1.2	34.3±1.1	32.1±0.6	26.9±1.5*‖¶
LVIDd, mm	25	4.07±0.03	4.06±0.07	4.13±0.06	4.55±0.14*†§
LVIDs, mm	25	2.78±0.04	2.70±0.07	2.80±0.06	3.33±0.17*†§
Anatomy					
BW, g	28	26±0.5	26±0.5	22±0.5*	24±0.9
HW, mg	28	113±2	146±5*	144±5*	190±13*†‡
TL, mm	28	18.8±0.03	18.8±0.03	18.3±0.01	18.6±0.01
HW/TL	28	6.02±0.12	7.82±0.28*	7.82±0.25*	9.99±0.59*†‡

angII indicates angiotensin II; AU, arbitrary unit; BW, body weight; FS, fractional shortening; HW, heart weight; LVIDd, left ventricular internal diameter in diastole; LVIDs, left ventricular internal diameter in systole; SBP, systolic blood pressure; TL, tibia length; WT, wild-type. NS, not significant (P>0.05).

*P<0.001 vs WT.

†P<0.001 vs *Notch3*$^{-/-}$.

‡P<0.001 vs WT+angII.

§P<0.01 vs WT+angII.

‖P<0.01 vs *Notch3*$^{-/-}$.

¶P<0.05 vs WT+angII.

arteries appeared similar in *Notch3*$^{-/-}$, SM-*RBPJκ*$^{-/-}$, WT, and control animals (Figure 1A; Figure S3A). After 4 weeks of angII infusion, the media-to-lumen ratio was lower in *Notch3*$^{-/-}$ and SM-*RBPJκ*$^{-/-}$ animals, compared with their respective hypertensive controls (Figure 1B), suggesting a lack of media hypertrophy in the absence of Notch3 signaling. Media hypertrophy was not accompanied with VSMC proliferation, as illustrated by the absence of Ki67 label (Figure S2A). Furthermore, 30% of the arteries of *Notch3*$^{-/-}$+angII mice were positive to the cleaved caspase 3 staining, a marker of apoptosis activation (Figure S2B). Additionally, the VSMCs of *Notch3*$^{-/-}$ and SM-*RBPJκ*$^{-/-}$ animals showed a decrease in F-actin (VSMC-to-cardiomyocyte optical density difference; Figure 1C) and *Acta2* mRNA levels (Table S2 and Figure S3B) and an increase in fibronectin with extra-domain A (fibronectin-EDA) (Figure 1A; Figure S3A). This alteration was also found in a model of WT+angII mice infused by *Notch3* antisens oligonucleotides (Figure S4), confirming the predominant role of Notch3 in this process. Altogether, these cellular features strongly suggested a transition from contractile to synthetic phenotype of VSMCs in Notch3 signaling-defective animals. Of note, *Notch3*$^{-/-}$ mice had a lower level of F-actin content in the VSMCs at baseline compared with WT and SM-*RBPJκ*$^{-/-}$; F-actin decrease in VSMCs was aggravated after angII-induced hypertension.

At the microvasculature level, *Notch3*$^{-/-}$ and SM-*RBPJκ*$^{-/-}$ mice exhibited a lower arteriolar density at baseline compared with WT and control mice (Figure 2A and 2B); arteriole density was not affected by angII and remained low. In contrast, capillary density was similar in all genotypes at baseline, but was markedly lower in *Notch3*$^{-/-}$ and SM-*RBPJκ*$^{-/-}$ mice after angII infusion compared with WT/control+AngII mice (Figure 2A and 2C). We therefore investigated angiogenic pathway that could account for such vascular alterations. We observed in *Notch3*$^{-/-}$ and SM-*RBPJκ*$^{-/-}$ mice subjected to angII a lower expression in vascular endothelial growth factor A (VEGFA) and VEGF receptor 2 (VEGFR) proteins (Figure 2D–2F; Table S2). Altogether, these data suggest that the inability of the vasculature to adapt to pressure overload in the absence of Notch3 signaling is associated with a decrease in angiogenic pathway and a synthetic VSMC phenotype.

Long-Term Impairment in Notch3 Signaling Promotes Cardiac Remodeling in Hypertensive Mice

One immediate consequence of capillary rarefaction is the imbalance between cardiomyocyte needs and supplies, which usually results in oxidative stress, inflammation, and fibrosis. In both *Notch3*$^{-/-}$ and SM-*RBPJκ*$^{-/-}$ mice, the production of superoxide anions measured in situ by dihydroethidium staining was higher than in controls, when subjected to angII (Figure 3B and

Downloaded from http://hyper.ahajournals.org/ at INSERM - DISC on July 14, 2016

Table 2. Biological and Cardiac Functional Data of Control and SM-RBPJκ$^{-/-}$ Mice After 28 Days of Angiotensin II Infusion

	Day	Groups			
		Control	*RBPJκ*$^{-/-}$	Control+angII	*RBPJκ*$^{-/-}$+angII
n		10	9	11	9
SBP, mm Hg	8	94±3	97±3	132±7*	137±7*†
SBP, mm Hg	28	94±5	99±5	150±7*	157±7*†
Mortality rate, %	8	0	0	11	37‡
Mortality rate, %	28	0	0	31	54‡
Echocardiography					
FS, %	6	31.2±0.7	31.9±1.1	33.0±1.1	19.8±1.0*†§
FS, %	25	31.5±1.4	31.9±1.7	33.7±0.9	18.2±0.7*‖¶
LVIDd, mm	6	4.10±0.05	4.07±0.05	4.04±0.06	4.73±0.08*†‡
LVIDs, mm	25	3.97±0.08	4.11±0.12	3.90±0.11	4.89±0.12*†‡
Anatomy					
BW, g	28	28.3±0.4	26.7±1.1	26.9±0.5	25.9±0.7
HW, mg	28	113±3	122±9	155±6*	166±7*†
TL, mm	28	18.9±0.1	18.7±0.1	19.1±0.1	18.6±0.1
HW/TL	28	6.02±0.18	6.53±0.45	8.08±0.30*	8.83±0.37*†

angII indicates angiotensin II; AU, arbitrary unit; BW, body weight; FS, fractional shortening; HW, heart weight; LVIDd, left ventricular internal diameter in diastole; LVIDs, left ventricular internal diameter in systole; SBP, systolic blood pressure; and TL, tibia length. NS, not significant (P>0.05).

*P<0.01 vs control.

†P<0.001 vs *RBPJκ*$^{-/-}$.

‡P<0.01 vs control+angII.

§P<0.001 vs control+angII.

‖P<0.01 vs *RBPJκ*$^{-/-}$.

¶P<0.05 vs control+angII.

3C). However, dihydroethidium staining was already higher at baseline in both genetic background compared with their respective controls, suggesting that the initial loss of Notch3 signaling rather than hypertension was responsible.

Although the production of superoxide anions was similar in both *Notch3*$^{-/-}$ and SM-*RBPJκ*$^{-/-}$ groups after angII infusion, all the other parameters we investigated were different between these 2 models. The oxidative damage of cardiac proteins in *Notch3*$^{-/-}$+angII mice (Figure 3D) could be associated with an increase in *Nox2* transcript level (Figure 3A). Furthermore, the myocardium of *Notch3*$^{-/-}$+angII was infiltrated with activated macrophages as illustrated by the presence of CD68-positive cells in cardiac cross-sections (Figure 3E), an increase in *Spp1*, *Cd68*, *Lgals3* (Table S2), and Galectin-3 (Figure 3F) levels. Finally, *Notch3*$^{-/-}$+angII mice exhibited active ongoing cardiac fibrosis compared with WT+angII, as illustrated by the picrosirius red staining (Figure 3G and 3H) and the increase in *Col1a1* and *Col1a3* and *Fn1* transcripts (Table S2). Of note, cardiac fibrosis was already observed in the *Notch3*$^{-/-}$ animals at baseline in absence of any signs of inflammation. In contrast, there was neither signs of inflammation nor fibrosis in SM-*RBPJκ*$^{-/-}$+angII animals without signs of acute HF (see below), suggesting that the oxidative stress in the hearts resulted from the short-term loss of Notch3 signaling, which led to inflammation and fibrosis later on.

Early Onset Acute Decompensated Heart Failure Is Associated With a Rapid Decrease in Angiogenic Pathway Activity

As mentioned earlier, we observed a peak of mortality around day 6 to 8 after the beginning of angII infusion in both *Notch3*$^{-/-}$ (36.7%) and SM-*RBPJκ*$^{-/-}$ (37.1%) mice. This time point corresponds to the onset of blood pressure plateau, that is, when maximal hypertension is established. Although some animals died of unknown cause, 81.2% of *Notch3*$^{-/-}$+angII and 53.8% of SM-*RBPJκ*$^{-/-}$ angII animals died from acute decompensated HF (ADHF). To evaluate the role of Notch3 signaling in the early cardiac death in absence of the long-term effect of *Notch3* loss of function, we further analyzed SM-*RBPJκ*$^{-/-}$ animals that developed or not early ADHF, in a context of dilated cardiomyopathy.

At day 6 to 8, all SM-*RBPJκ*$^{-/-}$ animals exhibited a similar decrease in fractional shortening and a cardiac dilatation. In addition to those symptoms, ADHF animals showed a dramatic decrease in cardiac output, lung congestion that reflects left ventricular dysfunction, and in some cases, anasarca that reflects right ventricular dysfunction (Figure 4A–4D). At the molecular level, ADHF was associated with a more intense cardiac oxidative stress associated with *Nox2*, *Lgals3*, *Col1a1*, and *Col1a3* mRNA induction (Figure 4E; Table S3) and a marked decrease in *Dll4* transcript levels, which reflects

Downloaded from http://hyper.ahajournals.org/ at INSERM - DISC on July 14, 2016

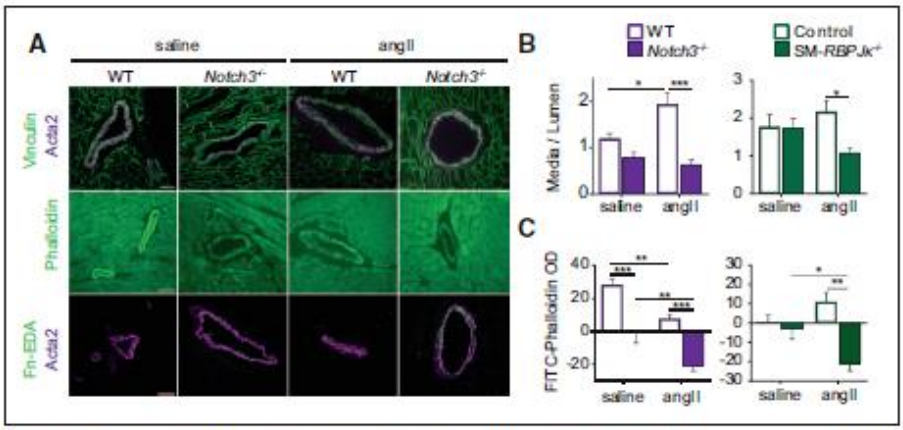


Figure 1. Impairment in Notch3 signaling blunted cardiac vasculature adaptation in response to hypertension. **A**, Representative cardiac cross-sections labeled with anti-vinculin and anti-α smooth muscle actin antibodies (Acta2, **top**), FITC-phalloidin (**middle**), and anti-fibronectin-EDA (Fn-EDA) and anti-Acta2 (**bottom**) in WT or *Notch3*$^{-/-}$ mice after angiotensin II (angII) or saline infusion. **B**, Measurement of coronary media hypertrophy using media/lumen area showed the lack of media hypertrophy induced by hypertension in the *Notch3*$^{-/-}$ (**left**) and SM-*RBPJκ*$^{-/-}$ (**right**) mice (n=4/group). **C**, Relative FITC–phalloidin optical density (OD) in the coronary media normalized to that of cardiomyocyte in *Notch3*$^{-/-}$ (**left**) and SM-*RBPJκ*$^{-/-}$ (**right**) mice (n=4/group). Values are expressed as means±SEM; *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001. Scale bars, 40 μm.

the output of the VEGFR2 signaling pathway (Figure 4H). Of note, SM-*RBPJκ*$^{-/-}$ animals that developed ADHF had lower levels of *Vegfa* transcript and VEGFR2 protein levels compared with controls treated with angII, showing a trend toward a decrease in the components of the VEGFA/VEGFR2 pathway in SM-*RBPJκ*$^{-/-}$ mice with ADHF (Figure 4F and 4G). In contrast to what was observed in animals after 4 weeks of angII infusion, there was no alteration of the arteriolar or capillary density, coronary arteries already exhibiting a lack of media hypertrophy in both groups of animals. Altogether, these data indicated that the short-term loss of Notch3 signaling can alter the activity of angiogenic pathway enough to promote fatal ADHF.

Discussion

We show here that the Notch3-RBPJκ signaling pathway is necessary to maintain both the differentiated state of VSMCs and the integrity of the coronary vasculature via the regulation of the VEGFA/VEGFR2/DLL4 pathway, in response to pressure overload. These results are paramount because this

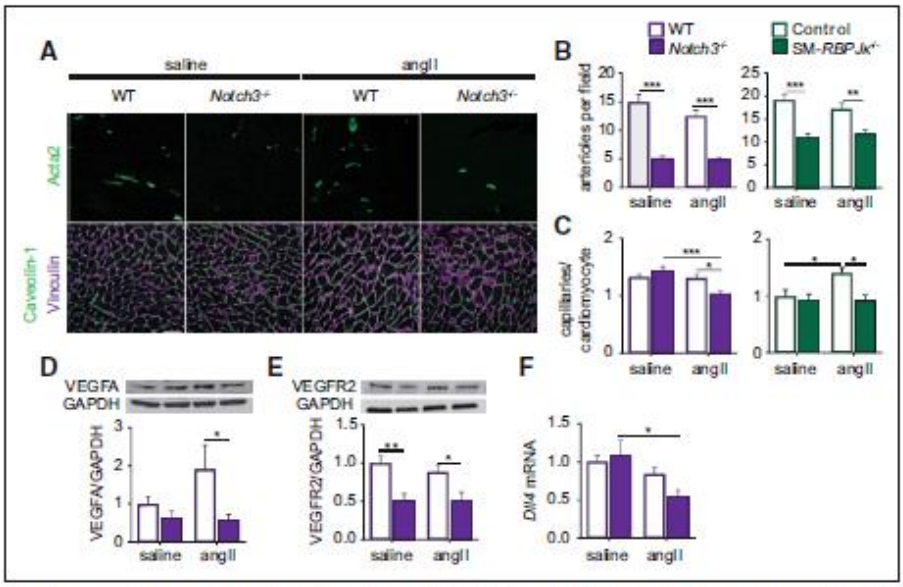


Figure 2. Alterations of microvasculature and angiogenic pathway in *Notch3*$^{-/-}$ and SM-*RBPJk*$^{-/-}$ mice are exacerbated by hypertension. **A**, Representative cardiac cross-sections of microvascular components in WT or *Notch3*$^{-/-}$ mice after angiotensin II (angII) or saline infusion (n=4/group): arterioles were identified with anti-Acta2 (**top**), capillaries with anti-caveolin-1 and cardiomyocytes with anti-vinculin antibodies (**bottom**). **B**, Arteriolar density in *Notch3*$^{-/-}$ (**left**) and SM-*RBPJk*$^{-/-}$ (**right**) mice after angII or saline infusion (n=4/group). **C**, Capillary density expressed as the number of capillaries per cardiomyocyte in the different conditions (n=4/group). **D** and **E**, Representative Western blots and quantification of VEGFA and VEGFR2 normalized to GAPDH. **F**, Quantitative polymerase chain reaction (PCR) analysis of cardiac delta-like 4 (*Dll4*) transcript expressed as fold-increase compared with WT (saline, n=15 for WT, n=14 for *Notch3*$^{-/-}$ and angII, n=16 for WT, n=12 for *Notch3*$^{-/-}$). Values are expressed as means±SEM; *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001. Scale bars, 40 μm.

Downloaded from http://hyper.ahajournals.org/ at INSERM - DISC on July 14, 2016

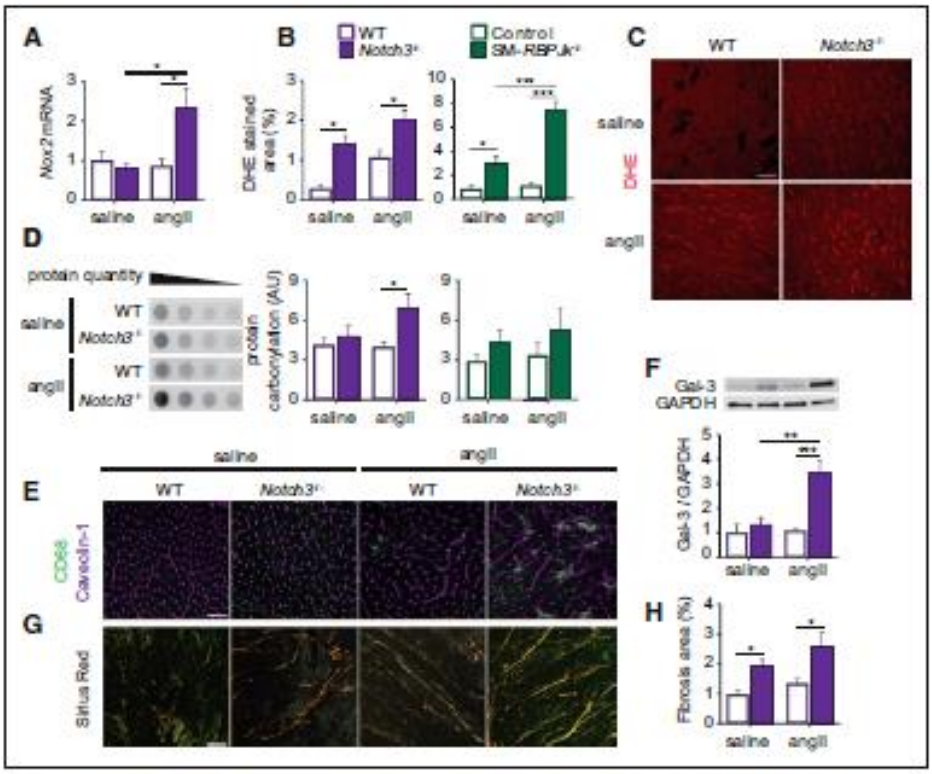


Figure 3. Cardiac phenotype of *Notch3*$^{-/-}$ and SM-*RBPJk*$^{-/-}$ mice after 28 days of angiotensin II (angII) infusion. **A**, Quantitative polymerase chain reaction (PCR) analysis of cardiac *Nox2* transcript expressed as fold-increase compared with WT (saline, n=15 for WT, n=14 for *Notch3*$^{-/-}$ and angII, n=16 for WT, n=12 for *Notch3*$^{-/-}$). **B** and **C**, Quantification of dihydroethidium (DHE) staining in WT, *Notch3*$^{-/-}$, and SM-*RBPJk*$^{-/-}$ mice after angII or saline infusion (n=4/group; **B**) and representative cardiac cross-sections of WT and *Notch3*$^{-/-}$ mice after angII or saline infusion (**C**). **D**, Representative immunodetection of protein carbonylation using oxyblot (**left**) and quantification in the hearts of *Notch3*$^{-/-}$ (**middle**) and SM-*RBPJk*$^{-/-}$ (**right**) mice after angII or saline infusion. **E**, Representative cardiac cross-sections showing macrophage (anti-CD68) infiltration in the myocardium counterlabeled for caveolin-1 (**top**). **F**, Expression of Galectin 3 (Gal-3) in *Notch3*$^{-/-}$ mice after angII or saline infusion and a representative immunoblot (top, n=6/group). **G**, Distribution of fibrillar collagens (picrosirius red staining) in cardiac cross-sections in *Notch3*$^{-/-}$ mice after angII or saline infusion observed under polarized light, and (**H**) quantification of the fibrosis area expressed in percentage (n=5 for saline condition and n=6 for angII condition). Values are means±SEM; *$P<0.05$, **$P<0.01$, ***$P<0.001$. Scale bars, 40 μm.

is the demonstration of a direct association between a primary alteration of the coronary vasculature and the development of chronic and acute decompensated HF, besides myocardial infarction.

Notch3 loss-of-function was previously shown to be protective in a monocrotaline-induced pulmonary hypertension.[16] In this model, proliferation of VSMCs in small pulmonary arteries leads to a detrimental increase in pulmonary artery resistance, which is dependent on Notch3 signaling. Because *Notch3*$^{-/-}$ mice subjected to angII-induced arterial hypertension exhibited a lower increase in blood pressure than their WT counterparts,[12] one may anticipate a similar benefit of the loss of Notch3 signaling in hypertension. To address this question, we analyzed the cardiac adaptation to pressure overload in a combination of a constitutive and a VSMC-specific models of Notch3 signaling impairment. These models allowed us to precise the role of Notch3 signaling in the VSMCs in the context of a hemodynamic challenge and to evaluate the cardiac impact of the short- and long-term loss of Notch3 signaling in the VSMCs.

At baseline, the fact that both *Notch3*$^{-/-}$ and VSMC-specific *RBPJκ* defective mice exhibited a decrease in arteriolar density strongly suggests that Notch3 is not only required during vascularization during development,[23] but also plays a major role in the maintenance of the coronary small arteries. The acquired low arteriolar density in adult SM-*RBPJκ*$^{-/-}$ animals implies an active and rapid arteriolar regression process in absence of Notch3 signaling in VSMCs, consistent with the proposed role of Notch3 in VSMC survival.[24] VSMCs of the *Notch3*$^{-/-}$ coronary arteries exhibited a low F-actin content, which is consistent with the decreased myogenic tone observed in these animals.[11] However, because the F-actin content in VSMCs was unaffected by the invalidation of *RBPJκ* in adult, the loss of Notch3 signaling does not seem essential to the maintenance of the contractile properties of VSMCs.[25] Importantly, arteriolar rarefaction was associated with oxidative stress in both models, suggesting an immediate impact on cardiac perfusion, although the cardiac function was unaltered. Furthermore, the cardiac hypertrophy and fibrosis in *Notch3*$^{-/-}$ mice, in a genetic background usually poorly prone to fibrosis C57Bl/6,[26] strongly suggest that transient variations in hemodynamics under normal living conditions are sufficient to promote a phenotype that is usually observed in hypertensive patients. Altogether, these results

Downloaded from http://hyper.ahajournals.org/ at INSERM - DISC on July 14, 2016

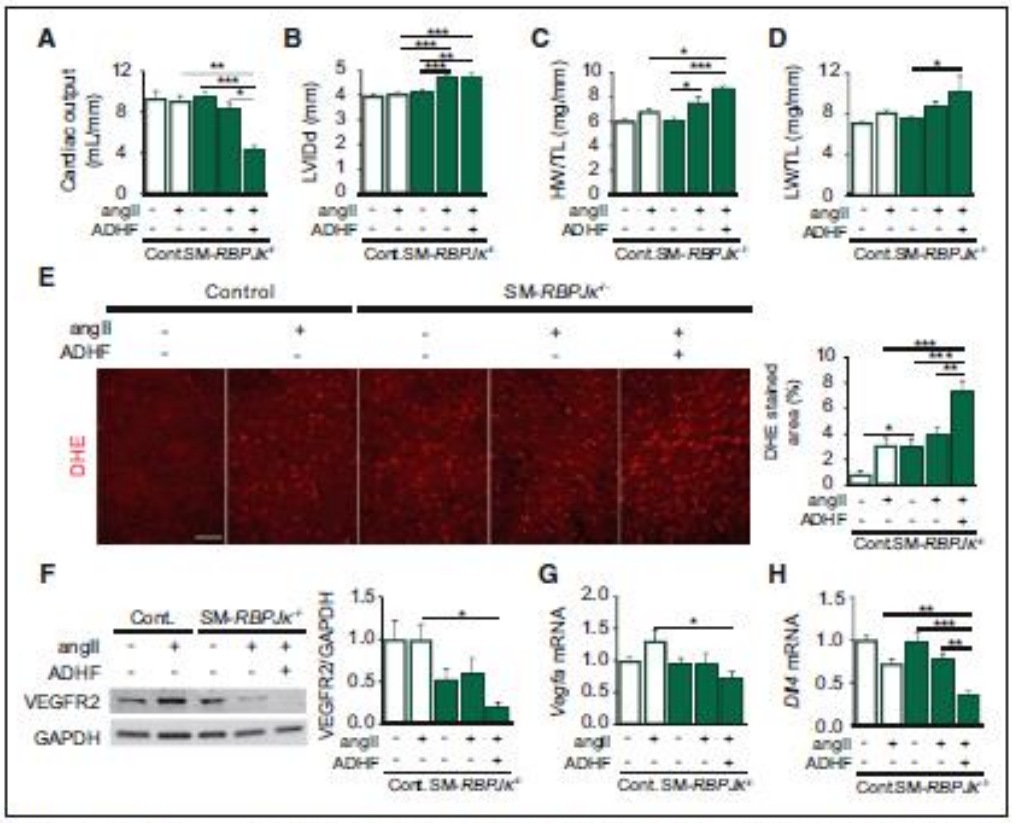


Figure 4. SM-*RBPJκ*$^{-/-}$ mice developed severe heart failure after angiotensin II (angII)–induced hypertension by 8 days. Cardiac output (**A**), left ventricular (LV) internal diameter in diastole (LVIDd, **B**), heart weight/tibia length ratio (HW/TL, **C**), and lung weight/tibia length ratio (LW/TL, **D**) in control (Cont) and SM-*RBPJκ*$^{-/-}$ mice after 8 days of saline or angII infusion (saline: n=10 for control, n=9 for SM-*RBPJκ*$^{-/-}$; angII: n=13 for control, n=9 for SM-*RBPJκ*$^{-/-}$, n=7 for SM-*RBPJκ*$^{-/-}$ with acute decompensated heart failure [+ADHF]). **E**, Representative cardiac cross-sections (**left**) and quantification (**right**) of dihydroethidium (DHE) staining in controls and SM-*RBPJκ*$^{-/-}$ mice after 8 days of angII or saline infusion (n=4/group). **F**, Cardiac VEGFR2 immunoblot expression normalized to GAPDH (**left**) and quantification (**right**) (n=7/group). Quantitative PCR of *Vegfa* (**G**) and Delta-like 4 (*Dll4*; **H**) transcripts expressed as fold-increase compared with WT (n=9–13 as above). Values are means±SEM; *$P<0.05$, **$P<0.01$, ***$P<0.001$. Scale bars, 40 μm.

indicate that either constitutive or acquired defect in Notch3 signaling induces a functionally silent cardiomyopathy in adult and the incapacity of the coronary tree to adapt to minor hemodynamic variations.

In response to angII-induced hypertension and contrary to *Notch3*$^{-/-}$ animals subjected to pulmonary hypertension, both *Notch3*$^{-/-}$ and SM-*RBPJκ*$^{-/-}$ animals developed cardiac systolic dysfunction, as illustrated by the rapid decrease in fractional shortening. Furthermore, a significant proportion of the animals from both backgrounds developed an early and fatal ADHF with typical features of acute cardiac dysfunction, such as decrease in cardiac output, organ congestion, and anasarca. In *Notch3*$^{-/-}$ and SM-*RBPJκ*$^{-/-}$ mice that survived 28 days of angII infusion, the media of coronary arteries was not hypertrophied, VSMCs shifted from a contractile to a synthetic phenotype, and capillary density was reduced in association with a decrease in VEGFR2 signaling. Animals studied after 8 days of angII infusion only exhibited VSMCs with a synthetic phenotype and a lack of media hypertrophy, suggesting that the phenotype observed at day 28 resulted from these initial events. Of note, the vascular phenotype of mice that developed an early fatal ADHF was similar to those which survived throughout the protocol; the only differences being a dramatic and rapid increase in oxidative stress along with a marked decrease in VEGFR2 signaling. Therefore, the early mortality observed was likely because of the acute onset of the same deleterious processes that otherwise progressively developed over 28 days. Altogether, these data indicate that Notch3 signaling plays a critical role in the vasculature adaptation to hemodynamic challenge. Furthermore, these data highlighted that the absence of adaptive media hypertrophy to hypertension is deleterious for the cardiac adaptation to pressure overload and independently from cardiomyocyte hypertrophy. These data parallel those found in cardiomyocytes and strongly suggest that the development of therapeutics that would solely block cardiomyocyte or media hypertrophy without blocking the main cause, that is, pressure overload, will be harmful in some instances.[27]

From a clinical standpoint, NOTCH signaling has emerged as a key player in diseases affecting the cardiovascular system.[28–30] Indeed, *JAG1* and *NOTCH2* mutations are responsible for the Alagille syndrome,[31,32] and mutations in the *MIB1* gene have been associated with left ventricular noncompaction cardiomyopathy, reviewed in Towbin et al.[33] To date, *NOTCH3* mutations have been associated with CADASIL[15] and pulmonary hypertension.[34] The phenotype observed

Downloaded from http://hyper.ahajournals.org/ at INSERM - DISC on July 14, 2016

in *Notch3*$^{-/-}$ mice strongly suggests that loss-of-function mutations of *NOTCH3*—different from those identified in CADASIL—could be responsible for cardiomyopathy that would become clinically symptomatic on hemodynamic challenging conditions. Indeed, the phenotype of angII-induced hypertensive *Notch3*$^{-/-}$ and SM-*RBPJκ*$^{-/-}$ animals recapitulates what is observed in patients with an idiopathic dilated cardiomyopathy: alteration of the coronary vasculature and capillary rarefaction,[6] which is strongly related to a decrease in coronary flow reserve.[7]

In conclusion, we showed for the first time that the hypertrophy of coronary arterial media on pressure overload is mandatory to initially maintain a normal cardiac function and is regulated by the Notch3/RBPJκ pathway. These observations extend the role of Notch3 in VSMC proliferation observed in vitro[35] and in pulmonary hypertension[16] to that of VSMC survival and maintenance of the contractile phenotype. Finally, this work highlights Notch3 signaling as an important factor to consider in future investigations regarding the molecular mechanisms involved in the vascular adaptation on hemodynamic challenge.

Perspectives

Given the deleterious effect of NOTCH3 activity in the development of pulmonary hypertension,[16] acute kidney disease,[36] and some cancers,[37,38] antagonists of NOTCH3 signaling have been considered as potential therapy. However, our data challenge the development of such therapeutic approach because the immediate cardiovascular impact could be disastrous similar to the cardiotoxic effects of anti-angiogenic drugs, such as bevacizumab and sunitinib used in cancer therapy.[39]

Acknowledgments

We thank Zela Keuylian and Ines Da Costa for technical assistance.

Sources of Funding

This work was supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Paris Diderot University, the Agence Nationale pour la Recherche (Grants HYPERNOTCH and ACTIVENOTCH), and the Société Française d'Hypertension. H. Ragot is a doctoral fellow of Pierre and Marie Curie University's Ecole Doctorale (ED394).

Disclosures

None.

References

1. De Boer RA, Pinto YM, Van Veldhuisen DJ. The imbalance between oxygen demand and supply as a potential mechanism in the pathophysiology of heart failure: the role of microvascular growth and abnormalities. *Microcirculation*. 2003;10:113–126. doi: 10.1038/sj.mn.7800188.
2. Swynghedauw B. Molecular mechanisms of myocardial remodeling. *Physiol Rev*. 1999;79:215–262.
3. Lacolley P, Regnault V, Nicoletti A, Li Z, Michel JB. The vascular smooth muscle cell in arterial pathology: a cell that can take on multiple roles. *Cardiovasc Res*. 2012;95:194–204. doi: 10.1093/cvr/cvs135.
4. Majesky MW. Adventitia and perivascular cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2015;35:e31–e35. doi: 10.1161/ATVBAHA.115.306088.
5. Walsh K, Shiojima I. Cardiac growth and angiogenesis coordinated by intertissue interactions. *J Clin Invest*. 2007;117:3176–3179. doi: 10.1172/JCI34126.
6. Abraham D, Hofbauer R, Schäfer R, Blumer R, Paulus P, Miksovsky A, Traxler H, Kocher A, Aharinejad S. Selective downregulation of VEGF-A(165), VEGF-R(1), and decreased capillary density in patients with dilative but not ischemic cardiomyopathy. *Circ Res*. 2000;87:644–647.
7. Tsagalou EP, Anastasiou-Nana M, Agapitos E, Gika A, Drakos SG, Terrovitis JV, Ntalianis A, Nanas JN. Depressed coronary flow reserve is associated with decreased myocardial capillary density in patients with heart failure due to idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*. 2008;52:1391–1398. doi: 10.1016/j.jacc.2008.05.064.
8. Bianchi S, Dotti MT, Federico A. Physiology and pathology of notch signalling system. *J Cell Physiol*. 2006;207:300–308. doi: 10.1002/jcp.20542.
9. Kopan R. Notch: a membrane-bound transcription factor. *J Cell Sci*. 2002;115(pt 6):1095–1097.
10. Monet M, Domenga V, Lemaire B, Souilhol C, Langa F, Babinet C, Gridley T, Tournier-Lasserve E, Cohen-Tannoudji M, Joutel A. The archetypal R90C CADASIL-NOTCH3 mutation retains NOTCH3 function in vivo. *Hum Mol Genet*. 2007;16:982–992. doi: 10.1093/hmg/ddm042.
11. Belin de Chantemele EJ, Retailleau K, Pinaud F, Vessieres E, Bocquet A, Guihot AL, Lemaire B, Domenga V, Baufreton C, Loufrani L, Joutel A, Henrion D. Notch3 is a major regulator of vascular tone in cerebral and tail resistance arteries. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008;28:2216–2224.
12. Boulos N, Helle F, Dussaule JC, Placier S, Milliez P, Djudjaj S, Guerrot D, Joutel A, Ronco P, Boffa JJ, Chatziantoniou C. Notch3 is essential for regulation of the renal vascular tone. *Hypertension*. 2011;57:1176–1182. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.170746.
13. Joutel A, Corpechot C, Ducros A, et al. Notch3 mutations in CADASIL, a hereditary adult-onset condition causing stroke and dementia. *Nature*. 1996;383:707–710. doi: 10.1038/383707a0.
14. Lesnik Oberstein SA, Jukema JW, Van Duinen SG, Macfarlane PW, van Houwelingen HC, Breuning MH, Ferrari MD, Haan J. Myocardial infarction in cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (CADASIL). *Medicine (Baltimore)*. 2003;82:251–256. doi: 10.1097/01.md.0000085054.63483.40.
15. Joutel A. Pathogenesis of CADASIL: transgenic and knock-out mice to probe function and dysfunction of the mutated gene, Notch3, in the cerebrovasculature. *Bioessays*. 2011;33:73–80. doi: 10.1002/bies.201000093.
16. Li X, Zhang X, Leathers R, Makino A, Huang C, Parsa P, Macias J, Yuan JX, Jamieson SW, Thistlethwaite PA. Notch3 signaling promotes the development of pulmonary arterial hypertension. *Nat Med*. 2009;15:1289–1297. doi: 10.1038/nm.2021.
17. Krebs LT, Xue Y, Norton CR, Sundberg JP, Beatus P, Lendahl U, Joutel A, Gridley T. Characterization of Notch3-deficient mice: normal embryonic development and absence of genetic interactions with a Notch1 mutation. *Genesis*. 2003;37:139–143. doi: 10.1002/gene.10241.
18. Han H, Tanigaki K, Yamamoto N, Kuroda K, Yoshimoto M, Nakahata T, Ikuta K, Honjo T. Inducible gene knockout of transcription factor recombination signal binding protein-J reveals its essential role in T versus B lineage decision. *Int Immunol*. 2002;14:637–645.
19. Wirth A, Benyó Z, Lukasova M, Leutgeb B, Wettschureck N, Gorbey S, Orsy P, Horváth B, Maser-Gluth C, Greiner E, Lemmer B, Schütz G, Gutkind JS, Offermanns S. G12-G13-LARG-mediated signaling in vascular smooth muscle is required for salt-induced hypertension. *Nat Med*. 2008;14:64–68. doi: 10.1038/nm1666.
20. Deng GG, Martin-McNulty B, Sukovich DA, Freay A, Halks-Miller M, Thinnes T, Loskutoff DJ, Carmeliet P, Dole WP, Wang YX. Urokinase-type plasminogen activator plays a critical role in angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysm. *Circ Res*. 2003;92:510–517. doi: 10.1161/01.RES.0000061571.49375.E1.
21. Gavazzi G, Deffert C, Trocme C, Schäppi M, Herrmann FR, Krause KH. NOX1 deficiency protects from aortic dissection in response to angiotensin II. *Hypertension*. 2007;50:189–196. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.089706.
22. Fouillade C, Baron-Menguy C, Domenga-Denier V, Thibault C, Takamiya K, Huganir R, Joutel A. Transcriptome analysis for Notch3 target genes identifies Grip2 as a novel regulator of myogenic response in the cerebrovasculature. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013;33:76–86. doi: 10.1161/ATVBAHA.112.251736.
23. Liu H, Zhang W, Kennard S, Caldwell RB, Lilly B. Notch3 is critical for proper angiogenesis and mural cell investment. *Circ Res*. 2010;107:860–870. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.218271.
24. Campos AH, Wang W, Pollman MJ, Gibbons GH. Determinants of Notch-3 receptor expression and signaling in vascular smooth muscle cells: implications in cell-cycle regulation. *Circ Res*. 2002;91:999–1006.

Downloaded from http://hyper.ahajournals.org/ at INSERM - DISC on July 14, 2016

25. Tang Y, Urs S, Liaw L. Hairy-related transcription factors inhibit Notch-induced smooth muscle alpha-actin expression by interfering with Notch intracellular domain/CBF-1 complex interaction with the CBF-1-binding site. *Circ Res*. 2008;102:661–668. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.107.165134.
26. Walkin L, Herrick SE, Summers A, Brenchley PE, Hoff CM, Korstanje R, Margetts PJ. The role of mouse strain differences in the susceptibility to fibrosis: a systematic review. *Fibrogenesis Tissue Repair*. 2013;6:18. doi: 10.1186/1755-1536-6-18.
27. Crozatier B, Ventura-Clapier R. Inhibition of hypertrophy, per se, may not be a good therapeutic strategy in ventricular pressure overload: other approaches could be more beneficial. *Circulation*. 2015;131:1448–1457. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.114.013895.
28. Nemir M, Pedrazzini T. Functional role of Notch signaling in the developing and postnatal heart. *J Mol Cell Cardiol*. 2008;45:495–504. doi: 10.1016/j.yjmcc.2008.02.273.
29. Gude N, Sussman M. Notch signaling and cardiac repair. *J Mol Cell Cardiol*. 2012;52:1226–1232. doi: 10.1016/j.yjmcc.2012.03.007.
30. Pérez-Pomares JM, de la Pompa JL. Signaling during epicardium and coronary vessel development. *Circ Res*. 2011;109:1429–1442. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.111.245589.
31. Oda T, Elkahloun AG, Pike BL, Okajima K, Krantz ID, Genin A, Piccoli DA, Meltzer PS, Spinner NB, Collins FS, Chandrasekharappa SC. Mutations in the human Jagged1 gene are responsible for Alagille syndrome. *Nat Genet*. 1997;16:235–242. doi: 10.1038/ng0797-235.
32. Kamath BM, Bauer RC, Loomes KM, et al. NOTCH2 mutations in Alagille syndrome. *J Med Genet*. 2012;49:138–144. doi: 10.1136/jmedgenet-2011-100544.
33. Towbin JA, Lorts A, Jefferies JL. Left ventricular non-compaction cardiomyopathy. *Lancet*. 2015;386:813–825. doi: 10.1016/S0140-6736(14)61282-4.
34. Chida A, Shintani M, Matsushita Y, Sato H, Eitoku T, Nakayama T, Furutani Y, Hayama E, Kawamura Y, Inai K, Ohtsuki S, Saji T, Nonoyama S, Nakanishi T. Mutations of NOTCH3 in childhood pulmonary arterial hypertension. *Mol Genet Genomic Med*. 2014;2:229–239. doi: 10.1002/mgg3.58.
35. Baeten JT, Lilly B. Differential regulation of NOTCH2 and NOTCH3 contribute to their unique functions in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*. 2015;290:16226–16237. doi: 10.1074/jbc.M115.655548.
36. El Machhour F, Keuylian Z, Kavvadas P, Dussaule JC, Chatziantoniou C. Activation of Notch3 in glomeruli promotes the development of rapidly progressive renal disease. *J Am Soc Nephrol*. 2015;26:1561–1575. doi: 10.1681/ASN.2013090968.
37. Giovannini C, Baglioni M, Baron Toaldo M, Ventrucci C, D'Adamo S, Cipone M, Chieco P, Gramantieri L, Bolondi L. Notch3 inhibition enhances sorafenib cytotoxic efficacy by promoting GSK3b phosphorylation and p21 down-regulation in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*. 2013;4:1618–1631. doi: 10.18632/oncotarget.1221.
38. Yen WC, Fischer MM, Axelrod F, et al. Targeting Notch signaling with a Notch2/Notch3 antagonist (tarextumab) inhibits tumor growth and decreases tumor-initiating cell frequency. *Clin Cancer Res*. 2015;21:2084–2095. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-2808.
39. Bordun KA, Premecz S, daSilva M, et al. The utility of cardiac biomarkers and echocardiography for the early detection of bevacizumab- and sunitinib-mediated cardiotoxicity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2015;309:H692–H701. doi: 10.1152/ajpheart.00172.2015.

Novelty and Significance

What Is New?

- In this study, we showed that besides its role in the differentiation of vascular smooth muscle cells and in the vascular tone, Notch3 signaling is necessary for the vascular adaptation to hypertension. The consequence of Notch3 signaling impairment is a severe dilated cardiomyopathy that can progress to heart failure.

What Is Relevant?

- The hypertrophy of the media in response to hypertension seems to be critical for cardiac adaptation, and Notch3 plays a major role in this process. These data also propose *Notch3* mutations as potentially responsible for dilated cardiomyopathies and challenge the therapeutic development targeting the Notch3 pathway.

Summary

We investigate the role of Notch3 signaling pathway during angiotensin II–induced hypertension, in vivo. The *Notch3*$^{-/-}$ and SM-*RBPJκ*$^{-/-}$ hearts did not adapt to hypertension, which led to an early and fatal acute decompensated heart failure. Thus, the hypertrophy of coronary media on hypertension seems mandatory to maintain a cardiac function and is regulated by the canonical Notch3/RBPJκ pathway.

Downloaded from http://hyper.ahajournals.org/ at INSERM - DISC on July 14, 2016

Hypertension
Journal of the American Heart Association

Loss of Notch3 Signaling in Vascular Smooth Muscle Cells Promotes Severe Heart Failure Upon Hypertension

Hélène Ragot, Astrid Monfort, Mathilde Baudet, Fériel Azibani, Loubina Fazal, Régine Merval, Evelyne Polidano, Alain Cohen-Solal, Claude Delcayre, Nicolas Vodovar, Christos Chatziantoniou and Jane-Lise Samuel

Hypertension. 2016;68:392-400; originally published online June 13, 2016;
doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.116.07694
Hypertension is published by the American Heart Association, 7272 Greenville Avenue, Dallas, TX 75231
Copyright © 2016 American Heart Association, Inc. All rights reserved.
Print ISSN: 0194-911X. Online ISSN: 1524-4563

The online version of this article, along with updated information and services, is located on the World Wide Web at:
http://hyper.ahajournals.org/content/68/2/392

Data Supplement (unedited) at:
http://hyper.ahajournals.org/content/suppl/2016/06/13/HYPERTENSIONAHA.116.07694.DC1.html

Permissions: Requests for permissions to reproduce figures, tables, or portions of articles originally published in *Hypertension* can be obtained via RightsLink, a service of the Copyright Clearance Center, not the Editorial Office. Once the online version of the published article for which permission is being requested is located, click Request Permissions in the middle column of the Web page under Services. Further information about this process is available in the Permissions and Rights Question and Answer document.

Reprints: Information about reprints can be found online at:
http://www.lww.com/reprints

Subscriptions: Information about subscribing to *Hypertension* is online at:
http://hyper.ahajournals.org//subscriptions/

Downloaded from http://hyper.ahajournals.org/ at INSERM - DISC on July 14, 2016

ONLINE SUPPLEMENT

Loss of Notch3 signaling in vascular smooth muscle cells promotes severe heart failure upon hypertension

Hélène Ragot[1], Astrid Monfort[1], Mathilde Baudet[1], Fériel Azibani[1], Loubina Fazal[1], Régine Merval[1], Evelyne Polidano[1], Alain Cohen-Solal[1,2], Claude Delcayre[1], Nicolas Vodovar[1], Christos Chatziantoniou[3*] and Jane-Lise Samuel[1*]

1 Inserm UMR-S 942 and Paris Diderot University, Paris, France. 2 Department of Cardiology, Lariboisière Hospital, Paris, France. 3 Inserm UMR-S 1155 and Pierre and Marie Curie University, Paris, France

*These author equally contributed to this work

Correspondence should be addressed to:

Jane-Lise Samuel,

Inserm UMR-S 942

Hôpital Lariboisière,

41 Boulevard de la Chapelle

75475 Paris Cedex 10, France

Telephone number: +33 1 53 21 67 69

E mail : jane-lise.samuel@inserm.fr

EXPANDED METHODS

Animal models

In addition to models described in the material and method section, SMMHC-CreERT2 mice were also crossed with Rosa26-Stopfl-LacZ reporter mice(Soriano 1999) to monitor tamoxifen-induced Cre/Lox recombination.

Besides, Notch3 repression was also obtained by antisens Oligonucleotide strategy. Notch3 pathway blockade was achieved by a cocktail of two different sequences of oligonucleotides specifically targeting Notch3 mRNA as previously described. (El Machhour, Keuylian et al. 2015) For control groups, we designed a cocktail of two scrambled sequences. To achieve this aim, the antisens or scrambled oligonucleotides were diluted in saline sodium chloride and delivered by osmotic mini-pump for 28 days (1 µM per days) to WT adult male mice as described in method section.

Systolic Blood Pressure and Echocardiography

Systolic blood pressure was measured in vigil mice with a tail-cuff sphygmomanometer (Kent Scientific Corporation, Torrington, USA). Echocardiographic images were acquired using 14-MHz-linear-array transducer with a digital ultrasound system (ACUSSON S3000, Siemens Healthcare, Germany), as previously described. (Boulos, Helle et al. 2011)

Histological Assessments

Equatorial cryostat sections (7 µm) of the ventricles (LV and RV) were performed for histology and immunolabeling. Tissue sections were fixed in acetone for 15 minutes or dried at 20°C for 30 min, blocked with 5% BSA in PBS for 30 min and incubated with rabbit anti-Notch3 (1:200, Abcam, UK), mouse anti-fibronectin- ED-A (1:100, all from Sigma-Aldrich, France), mouse anti-α smooth muscle actin (Acta2) (1:500), mouse anti-vinculin (1:250), rabbit anti-caveolin-1 (1:200, Sigma), rabbit anti-cleaved caspase 3 (1:100, Cell Signaling, Ozyme, France), rat anti-CD68 (1:200, AbD Serotec, UK) antibodies in PBS for 1h30 at 20°C. Alexa Fluor-488 or -594 (1:250, Thermo-Fisher Scientific, France) secondary antibodies were used for detection. For polymerized actin detection and superoxide anions, sections were incubated in FITC-labeled phalloidin (0.33 µM in PBS, Sigma-Aldrich, France) or Dihydroethidium (37 µM in PBS, DHE, Sigma-Aldrich, France), respectively for 30 min in

a dark humidified chamber. All cross-sections were then mounted with Vectashield (Vector laboratories, Clinisciences, France). Collagen fibers were stained using picrosirius red (0.5% in saturated picric acid), dehydrated, mounted in Eukit (CML, France), and observed under polarized light.

Image analysis

All images were acquired on a Leica microscope using identical settings for exposure for each parameter (Leica Microsystems, France). All the measurements were performed blinded for experimental conditions using the IPLab software (BD Biosciences, USA). Coronary VSMC F-actin content was expressed as the VSMC-to-cardiomyocyte difference in FITC-phalloidin optical density for each section. (Parlakian et al. 2005) The FITC-phalloidin optical density of neighboring cardiomyocytes was used as internal control, to ensure the validity of the measure at the coronary levels (3 sections/heart and 4 mice/group). Superoxide anion production was quantified as the number of DHE-positive pixel normalized to the image area on 4 fields per section, 3 sections per heart, and 4 mice per group, and expressed as percent.

The amount of fibrosis was quantified as the Sirius red-positive area/total ventricular surface ratio on at least 5 fields per section, 3 sections per heart, and at least 5 mice per group. Arteriolar density was quantified as the number of arterioles (x10 magnification), using 8–11 fields per cross-section, 3 cross-sections per heart, and 4 mice per group. Coronary artery remodeling (diameters >20 µm) was evaluated by calculating the media-to-lumen ratio. Capillary density, defined as the capillary-to-cardiomyocyte ratio, was measured as the number of caveolin-1-labelled cells (endothelium) over the number of vinculin-positive cells (cardiomyocyte). A minimum of 4 fields per cross-section, 3 cross-sections per heart, and 4 mice per groups were used.

Gene Expression Analysis

For RT-quantitative PCR analyses, total RNA extraction from the left ventricles, reverse transcription and qPCR were performed as previously described. (Azibani, Devaux et al. 2012) mRNA data were normalized by the abundance of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*Gapdh*) mRNA for each sample with the comparative threshold method(Livak and Schmittgen 2001) and expressed as the relative change compared with the control sample. Primers are listed in Table S1.

Protein Analysis

Heart tissue was lysed and homogenized in lysis buffer (50 mM Tris HCl pH7.4, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl). Cell lysis buffer with 1% Na Deoxycholate and 1% Triton were used for vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2) and protein oxidation detection, respectively. After centrifugation (12000 rpm, 10 min, +4 °C), soluble proteins were quantified by Pierce BCA Protein Assay Kit (ThermoFischer Scientific, France). Supernatants were stored at −80 °C.

Western Blot Analysis

Protein extracts (20 µg) were subjected to SDS-PAGE polyacrylamide gels (Biorad) and transferred to 0.45-µm nitrocellulose membrane. Nitrocellulose blots were blocked and incubated with mouse anti-galectin 3 (1:1000, Thermo Fischer Scientific, France), rabbit anti-VEGFA (1:2000, Millipore, France), rabbit anti-VEGFR2 (1:1000, Cell signaling, Ozyme, France), or rabbit anti-Notch3 (1:1000, Abcam, UK) antibodies overnight at 4 °C. Blots were incubated with sheep anti-mouse (1:5000; GE Healthcare, France) or goat anti-rabbit (1:5000, Sigma-Aldrich, France) horseradish Peroxidase-Linked antibodies for 1 h at room temperature before being incubated with ECL Prime (GE Healthcare, France). Chemiluminescence was detected using a LAS 3000 (Fuji, France) and measured using MultiGauge V2.02 software (Fuji).

BIBLIOGRAPHY

1. Soriano P. Generalized lacz expression with the rosa26 cre reporter strain. *Nat Genet*. 1999;21:70-71.
2. El Machhour F, Keuylian Z, Kavvadas P, Dussaule JC, Chatziantoniou C. Activation of notch3 in glomeruli promotes the development of rapidly progressive renal disease. *J Am Soc Nephrol*. 2015;26:1561-1575.
3. Boulos N, Helle F, Dussaule JC, Placier S, Milliez P, Djudjaj S, Guerrot D, Joutel A, Ronco P, Boffa JJ, Chatziantoniou C. Notch3 is essential for regulation of the renal vascular tone. *Hypertension*. 2011;57:1176-1182.
4. Parlakian A, Charvet C, Escoubet B, Mericskay M, Molkentin JD, Gary-Bobo G, De Windt LJ, Ludosky MA, Paulin D, Daegelen D, Tuil D, Li Z. Temporally controlled onset of dilated cardiomyopathy through disruption of the srf gene in adult heart. *Circulation*. 2005;112:2930-2939.
5. Azibani F, Devaux Y, Coutance G, Schlossarek S, Polidano E, Fazal L, Merval R, Carrier L, Solal AC, Chatziantoniou C, Launay JM, Samuel JL, Delcayre C. Aldosterone inhibits the fetal program and increases hypertrophy in the heart of hypertensive mice. *PLoS One*. 2012;7:e38197.
6. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative pcr and the 2(-delta delta c(t)) method. *Methods*. 2001;25:402-408.

Table S1. *Forward and reverse primers sequences used to quantify gene expression by RT-qPCR.*

Gene	Forward primer sequences (5'-3')	Reverse primer sequences (5'-3')
Acta2	CTGACAGAGGCACCACTGAA	CTACTCCAGAGTCCAGCACA
Cd68	TTC TGC TGT GGA AAT GCA AG	AGAGGGGCTGGTAGGTTGAT
Col1a1	GCAGGTTCACCTACTCTGTCCT	CTTGCCCCATTCATTTGTCT
Col3a3	TCCCCTGGAATCTGTGAATC	TGAGTCGAATTGGGGAGAAT
Ctgf	CAAAGCAGCTGCAAATACCA	GGCCAAATGTGTCTTCCAGT
Dll4	CCTCTCGAACTTGGACTTGC	AGCTCCTGCTTAATGCCAAA
Flk1	CGCGGTGGTGACAGTATCTT	GCCAACACCCTGTGCAAGTCC
Fn	ACTGACGAAGAGCCCTTAC	AGATAACCGCTCCCATTCC
Gapdh	AACTTTGGCATTGTGGAAGG	ACACATTGGGGGTAGGAACA
Nox2	ACTGCGGAGAGTTTGGAAGA	GGTGATGACCACCTTTTGCT
Hes1	CCCACCTCTCTCTTCTGACG	AGGCGCAATCCAATATGAAC
Hes5	GCATCAACAGCAGCATAGAGCA	AGGTAGCTGAGACGGCCATCTC
Hey1	CTTTGATGGACCGAGGTGTT	TCCCTTCACCTCACTGCTCT
Hey2	TTCTGTCTCTTTCGGCCACT	TTTGTCCCAGTGCTTGTCTG
Heyl	CACTCCCTGAAGACGAAAGC	GCTCGTATGTCTGGTGCTGA
Lgals3	CAGTGCTCCTGGAGGCTATC	ATTGAAGCGGGGGTTAAAGT
Myh7	TGCAAAGGCTCCAGGTCTGAGTCT	GCCAACACCAACCTGTGCAAGTTC
Nos3	TATAGCCCGCATAGCGTATC	AAGCTGCAGGTATTTGATGC
Notch1	TGAGACTGCCAAAGTGTTGC	GTGGGAGACAGAGTGGGTGT
Notch2	CCTGAACGGGCAGTACATTT	GCGTAGCCCTTCAGACACT
Notch3	AGCTGGGTCCTGAGGTGAT	AGACAGAGCCGGTTGTCAAT
Nppa	CCTAAGCCCTTGTGGTGTGT	CAGAGTGGGAGAGGCAAGAC
Nppb	CAGCTCTTGAAGGACCAAGG	AGACCCAGGCAGAGTCAGAA
Rcan1	AGGTCCCTGTCATGCTTCTG	TCTGGACCCATTCCTTCTTG
Vefga	AAAGTGCTCCTCGAAGAGTCTCC	CCTTAATCCAGAAAGCCTGACATG

Table S2. *Cardiovascular Transcript levels in WT and* Notch3$^{-/-}$ *mice after 28 Days of angII infusion*

mRNA	**Groups**			
	WT	*Notch3*$^{-/-}$	WT+angII	*Notch3*$^{-/-}$+angII
n	15	14	16	*12*
Cardiac remodeling				
Nppa	1.00±0.14	1.29±0.3	13.04±2.97‡	7.48±1.26§
Nppb	1.00±0.14	1.61±0.40	4.14±0.79‡	2.42±0.55
Myh7	1.00±0.17	2.20±0.50	4.11±0.78*	4.47±1.26*§
Rcan1	1.00±0.06	1.07±0.14	2.94±0.62†	1.42±0.23$^{\#}$
Notch pathway				
Notch3	1.00±0.15	ND	0.68±0.10	ND
Notch1	1.00±0.13	0.84±0.10	0.83±0.17	0.46±0.05*
Notch2	1.00±0.13	0.62±0.09	0.58±0.08*	0.57±0.06*
Notch4	1.00±0.13	1.07±0.23	1.15±0.39	0.71±0.10
Hes1	1.00±0.10	0.74±0.10	0.74±0.07	0.77±0.13
Hes5*	1.00±0.49	0.14±0.08*	-	-
Hey1	1.00±0.16	0.59±0.12	1.05±0.48	1.04±0.16
Hey2	1.00±0.10	0.64±0.09	0.75±0.11	0.73±0.12
Heyl	1.00±0.12	0.69±0.26	0.47±0.03*	0.57±0.10
Vessel/angiogenesis				
Acta2	1.00±0.09	0.91±0.27	1.01±0.21	0.35±0.03*$^{\#}$
Nos3	1.00±0.09	1.14±0.15	0.96±0.13	0.51±0.05*$^{‖\#}$
Vegfa	1.00±0.08	0.96±0.13	1.08±0.12	0.65±0.09$^{\#}$
Flk1	1.00±0.16	0.64±0.08	0.64±0.10	0.46±0.11*
Oxidative stress/Inflammation				
Cd68	1.00±0.06	1.01±0.16	0.99±0.10	2.07±0.29*$^{‡‖\#}$
Lgals3	1.00±0.14	1.10±0.16	1.42±0.39	4.69±0.83*$^{‡‖\#}$
Spp1	1.00±0.29	0.45±0.12	0.80±0.22	2.60±0.65*$^{‖\#}$
Fibrosis				
Col1a1	1.00±0.11	1.42±0.25	1.24±0.17	2.73±0.42*$^{‡‖\#}$
Col3a1	1.00±0.17	0.93±0.25	0.81±0.13	1.57±0.30$^{\#}$
Fn1	1.00±0.13	1.65±0.29	1.16±0.16	3.49±0.52*$^{‡‖\#}$
Tgfb1	1.00±0.08	1.34±0.19*	1.12±0.09	1.35±0.13
Ctgf	1.00±0.11	4.30±1.58	6.92±1.73*	4.71±0.90

All the transcripts are measured in the heart except Hes5 only detectable in the thoracic aorta. WT indicates wild-type; angII, angiotensin II; ND, not detectable. * P <0.05 *vs* WT, † P <0.01 *vs* WT, ‡ P <0.001 *vs* WT, § P <0.05 *vs Notch3*$^{-/-}$, ‖ P <0.01 *vs Notch3*$^{-/-}$, # P <0.05 *vs* WT+angII.

Table S3. *Cardiac transcript levels in Control and SM-*RBPJ$\kappa^{-/-}$ *mice after 8 Days of angII infusion*

mRNA			**Groups**		
	Control	SM-*RBPJ*$\kappa^{-/-}$	Control +angII	SM-*RBPJ*$\kappa^{-/-}$ +angII	SM-*RBPJ*$\kappa^{-/-}$ +angII ADHF
n	10	9	13	8	7
Notch pathway					
Notch3	1.00±0.05	0.62±0.06*	0.89±0.19	0.62±0.17	0.40±0.10*
Notch1	1.00±0.08	0.93±0.07	0.62±0.13	0.69±0.17	0.50±0.06*
Notch2	1.00±0.05	0.90±0.09	0.81±0.16	0.84±0.12	0.73±0.12
Hes1	1.00±0.11	0.73±0.10	0.71±0.08	0.70±0.11	0.45±0.07*
Hey1	1.00±0.09	0.87±0.10	0.85±0.17	0.77±0.21	0.67±0.17
Hey2	1.00±0.13	0.73±0.09	0.57±0.14	0.54±0.19	0.43±0.10*
Heyl	1.00±0.06	0.89±0.09	0.75±0.18	0.79±0.15	0.57±0.03
Cardiac remodeling					
Nppb	1.00±0.21	1.35±0.12	1.77±0.23	2.53±0.47*	2.48±0.62
Myh7	1.00±0.12	0.95±0.15	1.45±0.28	2.95±0.70*†	3.25±0.76*†
Rcan1	1.00±0.09	1.12±0.13	1.90±0.60	1.68±0.52	1.41±0.28
Oxidative stress/Inflammation					
Lgals3	1.00±0.12	1.88±0.31	1.81±0.24	2.32±0.66	6.83±1.75*†
Nox2	1.01±0.08	1.19±0.12	0.80±0.16	0.73±0.15	1.68±0.31*†§#
Fibrosis					
Col1a1	1.00±0.09	0.92±0.06	3.22±0.79	2.49±0.91	7.67±2.82*†
Col3a1	1.00±0.10	1.06±0.12	2.52±0.63	2.78±0.80	5.17±1.28*†#

SM-*RBPJ*$\kappa^{-/-}$ indicates *RBPJ*$\kappa^{-/-}$ in smooth muscle cells wild-type; angII, angiotensin II; ADHF, acute decompensated heart failure. * P <0.05 *vs* Control, † P <0.05 *vs* SM-*RBPJ*$\kappa^{-/-}$, ‡ P <0.05 *vs* Control+angII -§ P <0.0001*vs* Control+angII, ‖ P <0.05 *vs* SM-*RBPJ*$\kappa^{-/-}$+angII, # P <0.01 *vs* SM-*RBPJ*$\kappa^{-/-}$+angII.

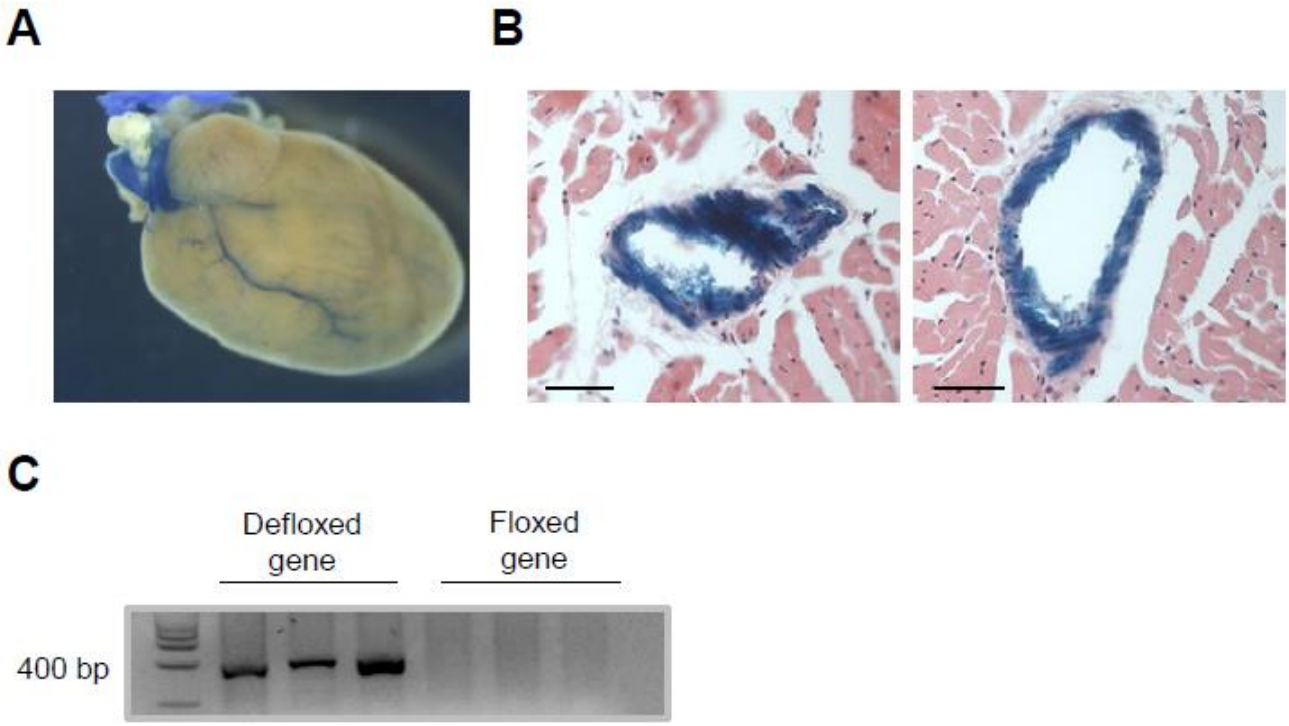


Figure S1. *SMMHC-CreERT2 leads to Cre/LoxP- mediated recombination by tamoxifen treatment in VSMC of coronary arteries.* (**A**-**C**) SMMHC-CreERT2 mice were crossed with ROSA26-Stopfl-LacZ reporter mice expressing galactosidase after deletion of a floxed cassette by Cre recombinase. Mice were treated by tamoxifen at 4-weeks of age for 5 constitutive days and sacrificed at 15-weeks. The heart was taken and stained with X-gal. The whole heart image revealed a staining in the coronary arteries in **A**. (**B**) Equatorial cryostat sections of the heart conterstained with Hematoxilin and Eosin, confirm a ßgal activity restricted to VSMC. SMMHC-CreERT2 mice were crossed with *RBP-Jκ$^{flox/flox}$* mice. Mice were treated with tamoxifen or oil at 4-weeks of age. To determine the inducible deletion of RBP-Jκ after tamoxifen treatment, caudal biopsies were taken on the mice at 6-weeks. Genomic DNA was analyzed for Cre/LoxP recombination by PCR. (**C**) Representative agarose gel confirming the efficiency of recombination. Scale Bars, 40 μm.

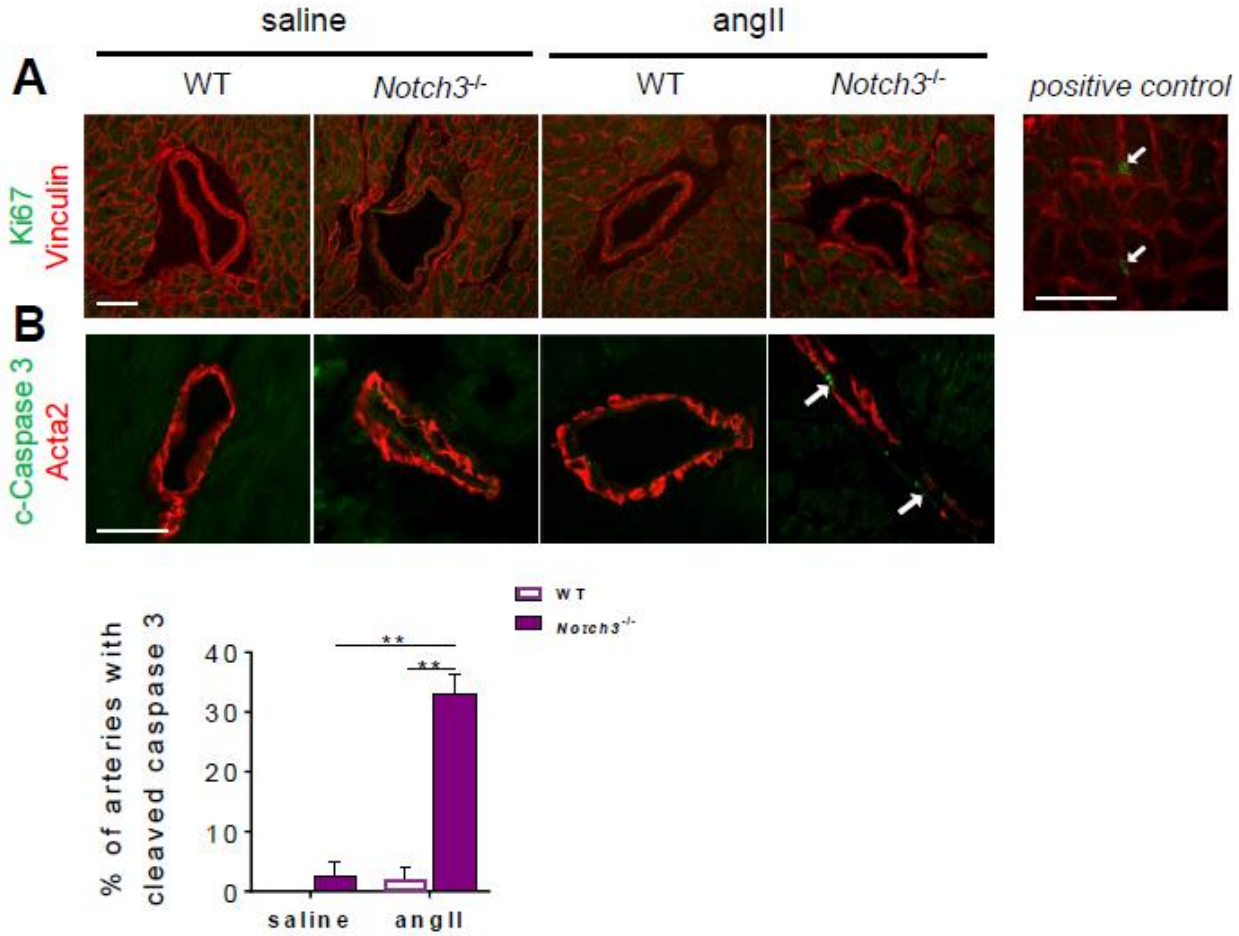


Figure S2. *AngII-induced hypertension induced apoptosis but not proliferation of the VSMCs in the heart* Notch3$^{-/-}$ *mice* . *(***A**) Immunolabeling of Ki67, marker of cellular proliferation (green), and Vinculin (red) in the hearts of WT and *Notch3*$^{-/-}$ mice after 28 days of angII or saline infusion (left panel). At the right, cardiac cross-section of WT+angII mice labeled with antibodies directed against Ki67 (green) and Vinculin (red) showing KI67-positive cells (fibroblasts), as immunolabeling positive control (right). (**B**) Immunolabeling of Cleaved Caspase 3 (c-Caspase 3), marker of apoptosis (green) and Acta2 (red) in the hearts of WT and *Notch3*$^{-/-}$ mice after 28 days of angII or saline infusion (top panel). At the buttom, percentage of arteries showing positive cleaved caspase 3 in VSMCs. Values are means ±SEM; $^{**}P<0.01$, n=3-4/group. Scale Bars, 40 µm.

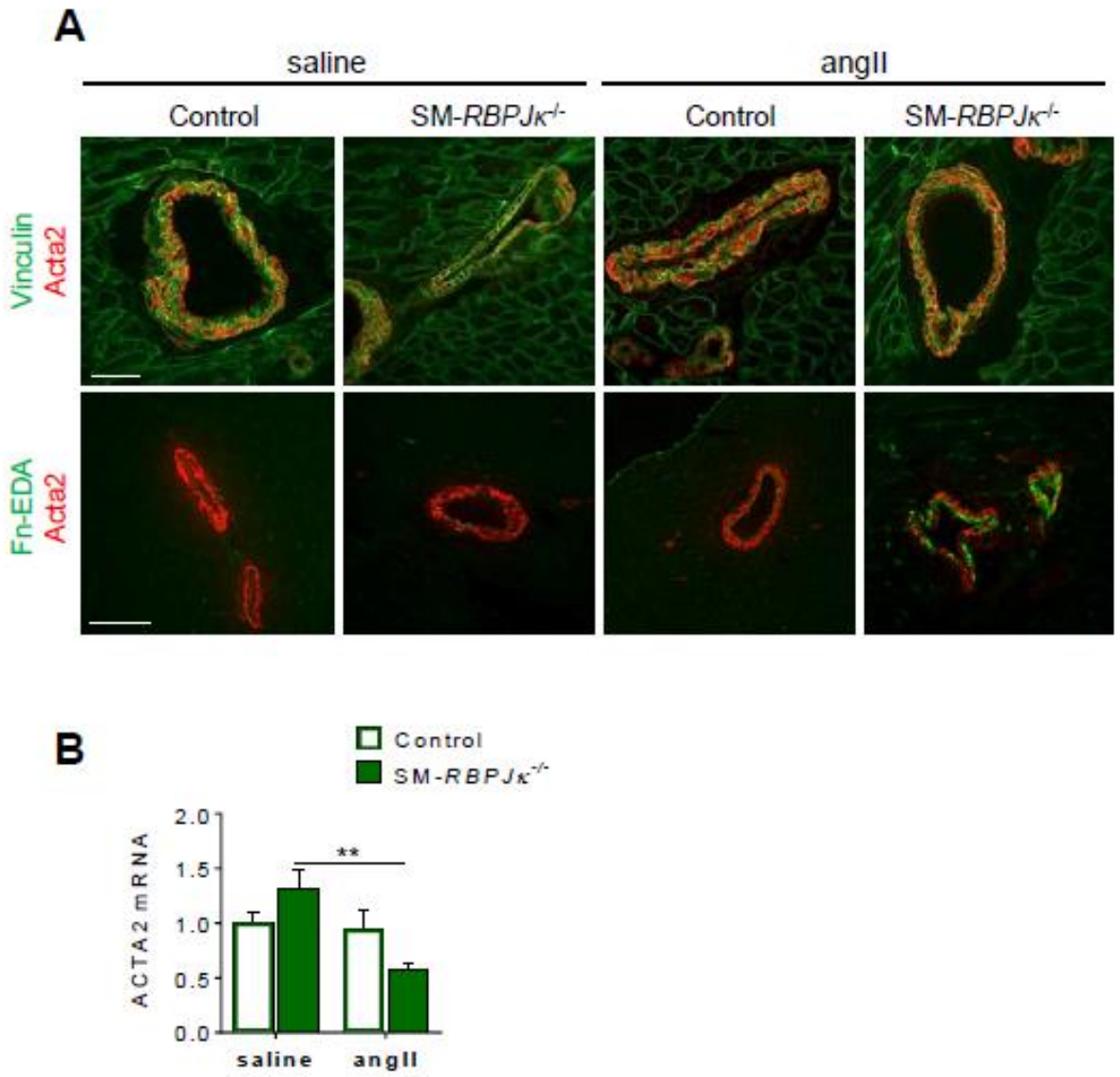


Figure S3. RBP-Jκ *deletion in the VSMCs induced shift towards synthetic phenotype in response to hypertension.* (**A**) Immunolabeling of Fibronectin-EDA (Fn-EDA, green) and Acta2 (red) in the coronary arteries. (**B**) qRT-PCR of *Acta2* transcript. (**C-D**) Cardiac capillary distribution using caveolin-1 (green) and vinculin (red) immunolabeling , graph of capillary density expressed as capillaries/cardiomyocyte. Values are means ±SEM; *p<0.05, ***P*<0.01, ****P*<0.001. n=8 to 10 and 4 for qPCR and immunofluorescence, respectively. Scale Bars, 40 µm.

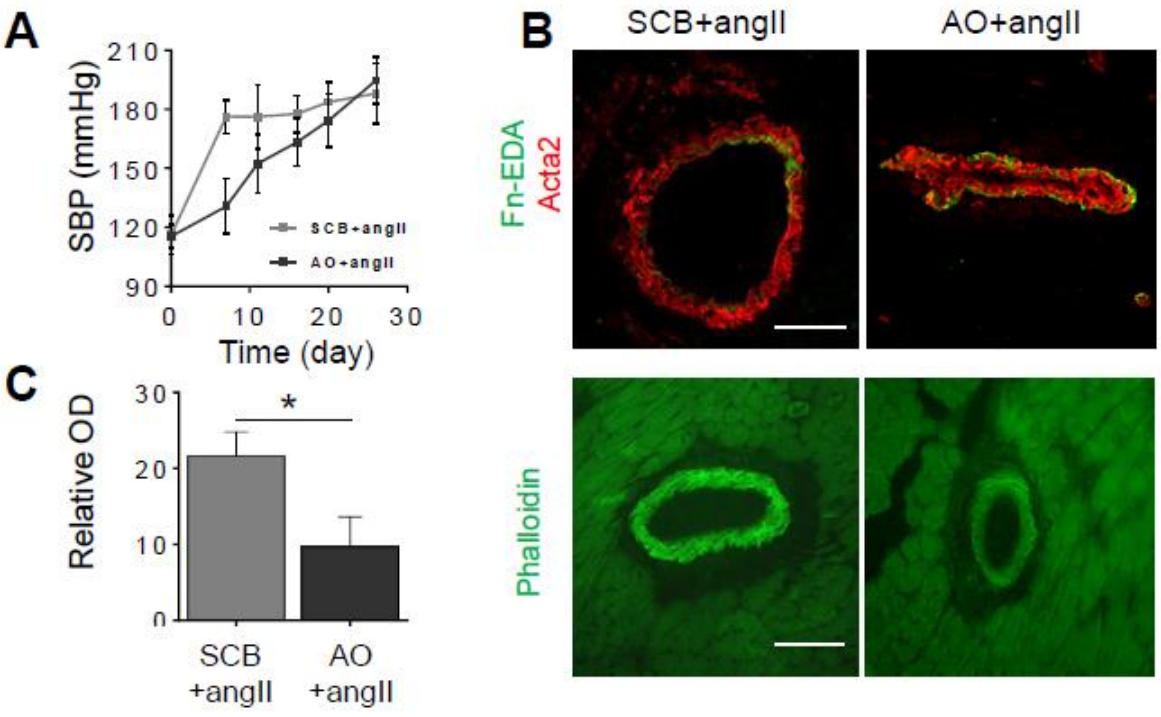


Figure S4. *Repression of Notch3 signaling by antisens oligonucleotides reduced F-actin content in the VSMCs.* (**A**) Systolic blood pressure in WT+angII mice receiving *Notch3* scrambled (SCB) or antisens (AO) oligonucleotides. (**B**) Immunolabeling against EDA -fibronectin (Fn-EDA, green) and Acta2 (red) in the coronary arteries, (**C**) Relative optical density of FITC-phalloidin staining in the coronary media normalized by difference to the cardiomyocyte label (left) and representative cardiac section (right). Scale Bars, 100 µm. Values are means ±SEM (n=4/group) ; *$P<0.05$ determined by Mann-Whitney test.

2. Chapitre 2 : Effet de l'invalidation de *Notch3* sur le remodelage cardiovasculaire induit par une surcharge de débit

Hélène Ragot, et al en préparation

2.1. Introduction

Nos premiers résultats ont permis de démontrer que la voie de signalisation de Notch3 est nécessaire au maintien de l'intégrité de la média artérielle lors de l'adaptation cardiaque à une surcharge de pression. De plus, nous avons montré pour la première fois que l'invalidation congénitale de Notch3 chez la souris entraîne une cardiomyopathie hypertrophique vraisemblablement associée à des défauts de l'arbre coronaire.

La poursuite de nos recherches visait à établir si dans un contexte de croissance cardiaque plus physiologique tel qu'un entraînement physique ou la gestation, l'invalidation de *Notch3* affectait la capacité du cœur à s'adapter à ces nouvelles conditions de charges. Pour cela, nous avons choisi d'explorer parallèlement deux modèles de surcharge de débit : l'entrainement physique modéré de 5 semaines chez les mâles et la gestation chez les femelles.

Contrairement à l'hypertrophie cardiaque secondaire à une situation pathologique, l'hypertrophie physiologique est dite adaptée car elle intègre un processus angiogénique majeur. Il en résulte notamment une densité microvasculaire maintenue voire augmentée (Hudlicka et al. 1992), sans défaut métabolique du compartiment mitochondrial (Ventura-Clapier et al. 2007), ni développement de fibrose cardiaque (Chung et al. 2012). Il y a ainsi une croissance harmonieuse entre l'augmentation de la taille des cardiomyocytes et le réseau microvasculaire adjacent via les voies angiogéniques du VEGF et des angiopoïétines principalement (Umar, Nadadur et al. 2012; Oka, Akazawa et al. 2014). Il est important de souligner que l'hypertrophie cardiaque physiologique induite par l'exercice ou la grossesse est un phénomène réversible dès l'arrêt des stimuli et que la régression n'affecte pas la fonction cardiaque à long terme (Maron, Pelliccia et al. 1993; Eghbali, Wang et al. 2006). Cette régression se caractérise par une signalisation anti-angiogénique impliquant l'activation de

voie du VEGFR1(FLT1) (Zhou and Liu 2014), ainsi que l'induction de sa forme soluble, sVEGFR1/sFLT1 (Damp, Givertz et al. 2016; Khan, Melikian et al. 2016). Au plan vasculaire, il est à noter que dans ce contexte de croissance physiologique, les réponses vasomotrices ne sont pas uniformes le long de l'arbre artériel, et impliquent les mécanismes suivants : la vasodilatation induite par le flux et médiée par l'endothélium, le contrôle du tonus myogénique, la vasodilatation métabolique, et le contrôle sympathique (Gielen et al. 2010). Certains des mécanismes sous-jacents sont parfaitement établis (voir section I 1.6) et la voie Notch3 apparaît impliquée dans la régulation de ces réponses vasomotrices (Belin de Chantemele, Retailleau et al. 2008). Cependant, nous ne connaissons pas les conséquences au stade adulte de l'absence de Notch3 dans les CMLV.

Notre hypothèse était que les défauts de l'arbre artériel, en particulier coronaire décrits chez la souris *Notch3*$^{-/-}$ (Ragot et al. 2016), pourraient avoir des conséquences délétères lors de l'adaptation du cœur à ces surcharges de débit. Le fait que les femelles *Notch3*$^{-/-}$ puissent mettre bas sans problème majeur nous a conduit à proposer que des différences selon le sexe biologique seraient impliquées.

Nos objectifs étaient de déterminer : 1- les effets de l'entrainement physique sur la cardiopathie des souris *Notch3*$^{-/-}$ et les mécanismes mis en jeu ; 2- si l'invalidation de *Notch3* chez la femelle entraîne une cardiopathie similaire à celles des mâles ; 3- les effets de l'invalidation de *Notch3* sur la capacité du système cardiovasculaire des femelles à s'adapter à une surcharge de débit induit par la gestation.

Les méthodes utilisées sont décrites dans la section « matériels et méthodes » du mémoire.

2.2. Résultats et discussion

2.2.1. Paramètres physiologiques des mâles et femelles *Notch3*$^{-/-}$

Nous avons analysé les paramètres physiologiques des souris mâles et femelles WT et *Notch3*$^{-/-}$ à l'état basal (Table 4). Les analyses échographiques ne révèlent pas d'altérations de la fonction cardiaque ni de dilatation ventriculaire chez les souris *Notch3*$^{-/-}$ mâles ou femelles. En revanche, contrairement aux souris mâles *Notch3*$^{-/-}$, les femelles *Notch3*$^{-/-}$ ne présentent pas d'hypertrophie ventriculaire significative à l'état basal.

Table 4 : Anatomical parameters of male or female WT and Notch3-/- mice at basal state

	Groups			
	Males		Females	
	WT	*Notch3*$^{-/-}$	WT	*Notch3*$^{-/-}$
n	14	13	11	*8*
Echocardiography				
LVIDd (mm)	3.9±0.1	4.0±0.1	3.5±0.1	3.5±0.2
FS (%)	32.9±1.6	30.36±2.4	37.6±1.6	32.1±2.7
Anatomy				
Body weight (mg)	26.4±0.7	26.1±0.7	21.2±0.5‡	21.1±0.8‖
LV+RV weight (mg)	109.1±3.8	**139.3±6.0‡**	100.0±3.4	**111.3±8.1‖**
Tibia Lengh (mm)	18.6±0.1	18.6±0.1	18.5±0.3	18.1±0.6
VW/TL (mg/mm)	5.8±0.2	**7.5±0.3‡**	5.4±0.2	**6.1±0.3‖**

WT indicates Wild-Type; LVIDd, left ventricular internal diameter in diastole; FS, fractional shortening; LV, left ventricle; RV, right ventricle; * P <0.05 *vs* WT $_{male}$, † P <0.01 *vs* WT $_{male}$, ‡ P <0.001 *vs* WT $_{male}$, § P <0.05 *vs Notch3*$^{-/-}$ $_{male}$, ‖ P <0.01 *vs Notch3*$^{-/-}$ $_{male}$, # P <0.001 *vs Notch3*$^{-/-}$ $_{male}$

2.2.2. Comparaison du phénotype cardiaque des souris femelles Notch3-/- par rapport aux mâles

Nous nous sommes focalisés sur la microcirculation cardiaque. Nous avons ainsi mesuré les densités artériolaire et capillaire, déterminées par immunomarquage α-actine de muscle lisse et cavéoline-1/vinculine, respectivement (Figure 13). Comme observé précédemment, les souris *Notch3*$^{-/-}$ mâles ont une moindre densité artériolaire à l'état basal par rapport aux souris WT (Ragot, Monfort et al. 2016). Fait important, les femelles présentent le même défaut (-60%, $p<0,001$, Figure 13A). La densité capillaire n'est en revanche pas modifiée dans les cœurs de ces souris (Figure 13B).

Concernant la signalisation de la voie angiogénique du VEGF, nous montrons que le niveau d'expression du transcrit du *VEGFA* et des formes membranaire et soluble du *VEGFR1* n'est pas modifié dans les cœurs de souris *Notch3*$^{-/-}$ mâles ou femelles par rapport aux WT. A noter que l'expression de *VEGFR1* est moindre dans les cœurs de souris femelles indépendamment du génotype. L'expression du transcrit *VEGFR2* est diminuée dans les cœurs des mâles *Notch3*$^{-/-}$ comme déjà observé (Ragot, Monfort et al. 2016), mais ne semble altérée chez les femelles (Figure 13D).

Ces résultats montrent que, malgré une altération microvasculaire similaire chez les femelles *Notch3*$^{-/-}$, ces dernières semblent avoir une meilleure adaptation cardiaque que les mâles *Notch3*$^{-/-}$ avec un moindre remodelage hypertrophique.

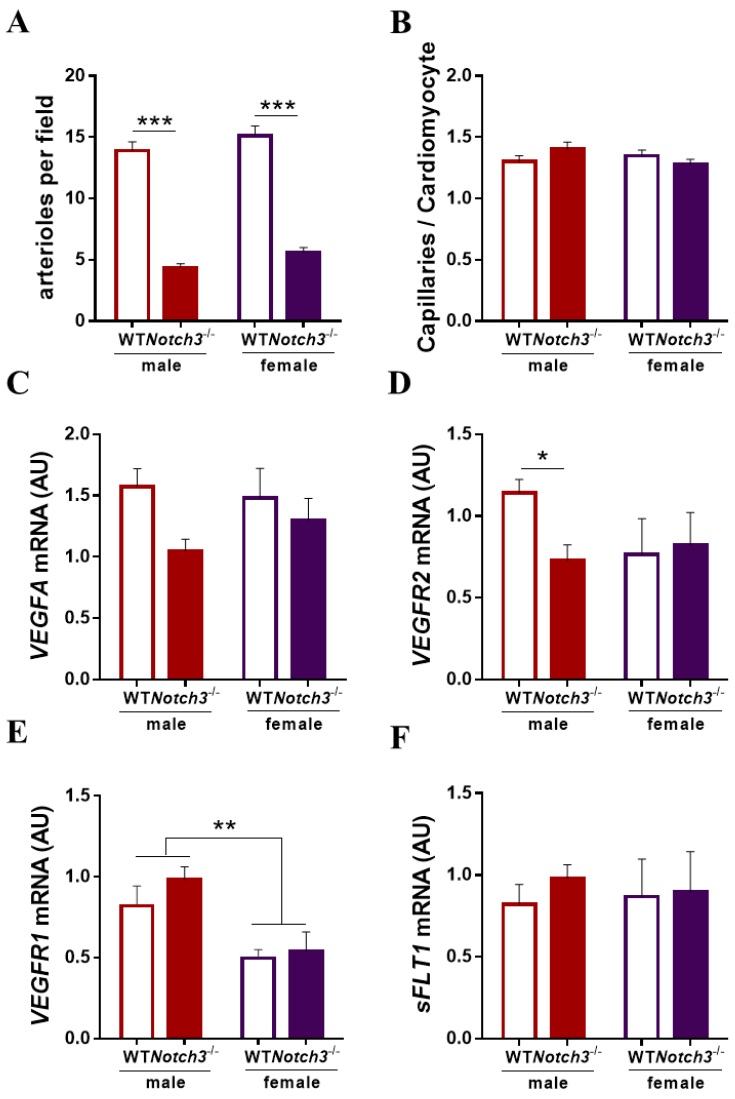


Figure 13 : Densités microvasculaires des souris WT et *Notch3*$^{-/-}$ mâles (rouge) ou femelles (violet). A- Densité artériolaire par champ déterminée par immunomarque α-actine de muscle lisse. **B-** Densité capillaire par cardiomyocyte déterminée par double immunomarquage cavéoline-1 (capillaire) et vinculine (cardiomyocyte) Immunomarquage de l'α-actine de muscle lisse (rouge) dans les ventricules gauches de souris WT ou *Notch3*$^{-/-}$ mâles ou femelles. **C-F-** Expression des transcrits du *VEGFA* (C) et des récepteurs *VEGFR2* (D), *VEGFR1* (E), et *sVEGFR1/sFLT1* (F) dans les cœurs de souris WT et *Notch3*$^{-/-}$ mâles ou femelles à l'état basal et après 5 semaines d'exercice physique ou une gestation par RT-PCR**.** *p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001.

2.2.3. Phénotype cardiaque des souris après une surcharge de débit

2.2.3.1. Explorations fonctionnelles

Au terme des 5 semaines d'exercice physique, aucune différence n'est observée en terme de tolérance à l'effort, évaluée par la distance cumulée parcourue et le nombre de stimuli électriques reçus entre les souris WT (gris) et *Notch3*$^{-/-}$ (rouge) (Figure 14). Par ailleurs, il est à noter qu'aucune mortalité des souris WT ou *Notch3*$^{-/-}$ n'a été observée secondaire aux protocoles d'exercice et de la gestation.

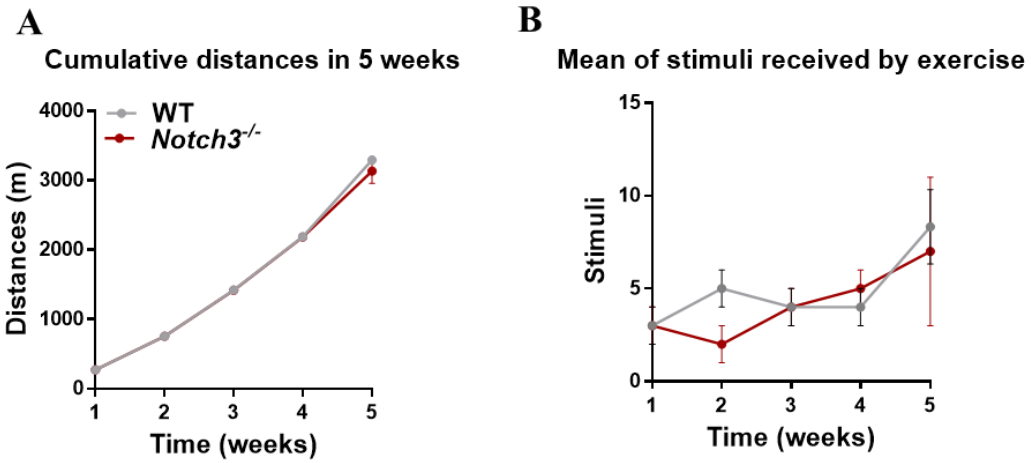


Figure 14 : Paramètres fonctionnels de l'exercice physique A. Distance cumulée chaque semaine réalisée au cours du protocole d'exercice physique par les souris WT et *Notch3*$^{-/-}$; mesure en mètre, **B.** Moyenne des stimuli électrique reçus chaque semaine au cours du protocole d'exercice physique par les souris WT et *Notch3*$^{-/-}$.

Les différentes études ont montré que le remodelage cardiovasculaire induit par un entrainement physique était associé à une fonction cardiaque stable voire augmentée (Diffee and Chung 2003). En revanche, les données concernant la grossesse divergent. En effet, alors que certaines études ne montrent pas de différences de fonction cardiaque (Savu et al. 2012), d'autres montrent une altération de la fonction systolique (Gonzalez et al. 2007; Chung et al.

2012) ou diastolique (Schannwell, Zimmermann et al. 2002) lors du troisième trimestre chez la femme enceinte. Ces résultats divergents pourraient être reliés au stade de grossesse au cours du troisième trimestre (précoce ou tardif). Par ailleurs, les analyses faites sur des modèles murins de gestation ont également noté une dysfonction cardiaque au stade tardif de grossesse, c'est-à-dire 1 à 2 jours avant la mise bas (Eghbali et al. 2005), qui serait plus reliée à une susceptibilité aux modifications de charge plus qu'à une atteinte de la contractilité cardiaque *per se* (Li et al. 2012). Fait important, cette dysfonction cardiaque en fin de grossesse est généralement transitoire et disparaît lors de la phase de post-partum.

Pour étudier la fonction cardiaque des souris, des échocardiographies ont été réalisées à l'état basal puis la cinquième semaine d'exercice ou dans les 24h qui suivaient la mise-bas. Alors que la fraction de raccourcissement (FR) des souris WT et *Notch3*$^{-/-}$ des mâles n'est pas modifiée après l'entrainement physique (Figure 15A), nous notons au stade post-partum une diminution de FR dans le groupe des femelles *Notch3*$^{-/-}$ par comparaison aux WT (Figure 15B), qui signe une modeste altération de la fonction cardiaque chez ces souris après la mise bas.

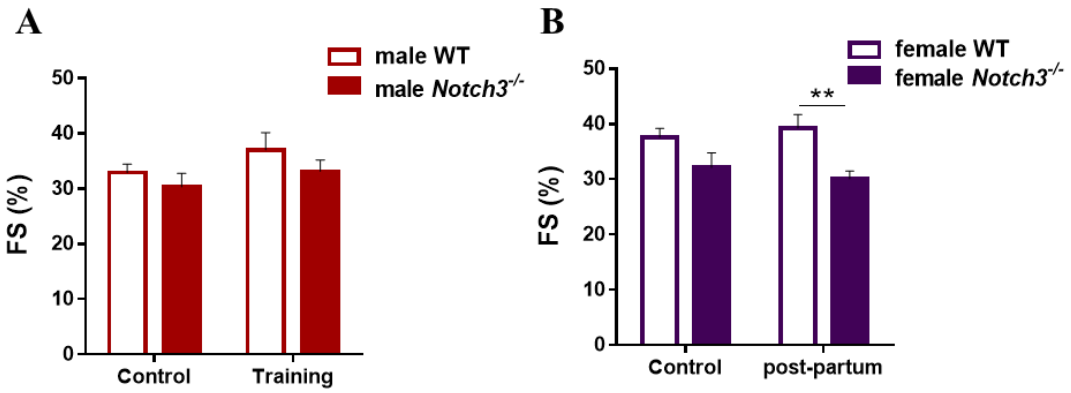


Figure 15 : Fraction de raccourcissement des ventricules gauches de souris WT ou *Notch3*$^{-/-}$ mâles (A) ou femelles (B) à l'état basal et après 5 semaines d'exercice physique ou une gestation, * p<0,05.

L'hypertrophie ventriculaire des souris a été déterminée en rapportant le poids des ventricules sur la longueur du tibia afin de s'affranchir des variabilités de poids corporel inhérentes à l'exercice physique ou à la grossesse (Figure 16).

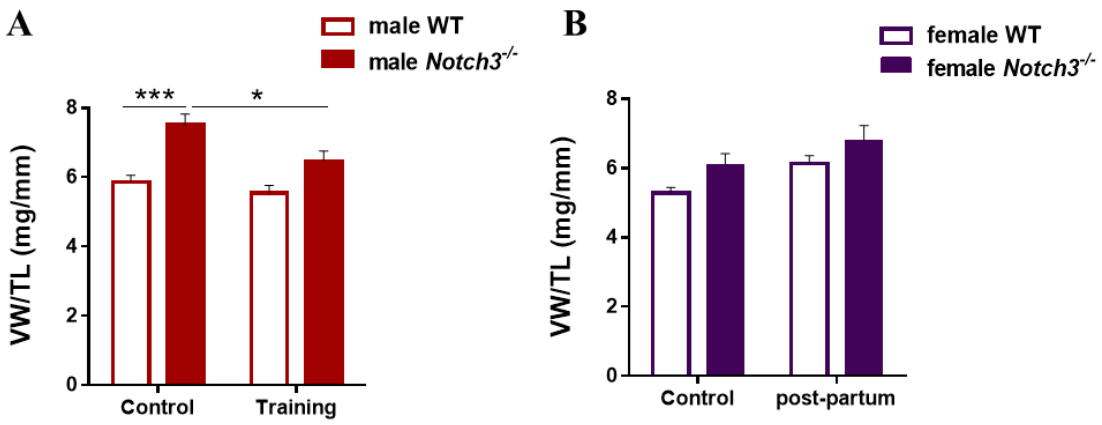


Figure 16 : Poids des ventricules de souris WT ou *Notch3*$^{-/-}$ mâles (A) ou femelles (B) à l'état basal et après 5 semaines d'exercice physique ou une gestation, normalisés sur la longueur du tibia. Notez l'hypertrophie cardiaque à l'état basal chez le mâle, *Notch3*$^{-/-}$ qui diminue avec 5 semaines d'entraînement physique, * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001.

Le protocole d'exercice n'a pas d'effet sur les paramètres anatomiques (poids corporel, poids du cœur) des souris WT, indiquant que l'intensité et/ou la durée du protocole utilisé n'était pas assez soutenue pour induire une hypertrophie cardiaque chez ces souris. En revanche, la Figure 16A montre que l'hypertrophie ventriculaire des souris *Notch3*$^{-/-}$ est réduite après 5 semaines d'entraînement physique. Cette observation suggère un effet bénéfique de l'entraînement physique chez ces souris comme observé dans d'autres modèles murins de remodelage cardiaque pathologique (Oliveira et al. 2009; Carneiro-Junior et al. 2013). De même chez l'Homme, la réadaptation par entrainement physique a été montrée

avoir des effets bénéfiques lors l'insuffisance cardiaque (Tabet et al. 2009; Aslanger et al. 2015), l'amélioration de la fonction cardiaque pouvant être due aux effets de l'EP sur les protéines de la voie calcique et les autres réponses conduisant à une réduction du remodelage cardiaque (Lu et al. 2002) (Medeiros et al. 2008).

En en situation de post-partum, nous observons un effet modeste du post-partum sur l'hypertrophie cardiaque similaire pour les souris WT et *Notch3*$^{-/-}$ (post-partum, $p<0,05$ en ANOVA 2 voies).

2.2.3.2. Production de ROS cardiaques

La génération du stress oxydant, résultant du déséquilibre de le balance pro-/anti-oxydante, est un des mécanismes impliqué dans le remodelage mal adaptatif du cœur (cf. section I 2.3.2.). La production de ROS dépend de l'intensité et de la durée du stimulus lors d'un exercice physique (Ahmadiasl et al. 2012; Boccatonda et al. 2016) et est augmentée à la phase précoce du post-partum (Toescu et al. 2002). Cependant, contrairement au remodelage pathologique, la production de ROS induite par l'entrainement physique ou le post-partum s'accompagne d'une augmentation de la capacité anti-oxydante des cardiomyocytes. La résultante conduit à une balance équilibrée des réponses pro- et anti-oxydantes. Par ailleurs, l'entrainement physique a été montré diminuer la production de ROS induite lors d'un remodelage pathologique (Ma et al. 2015).

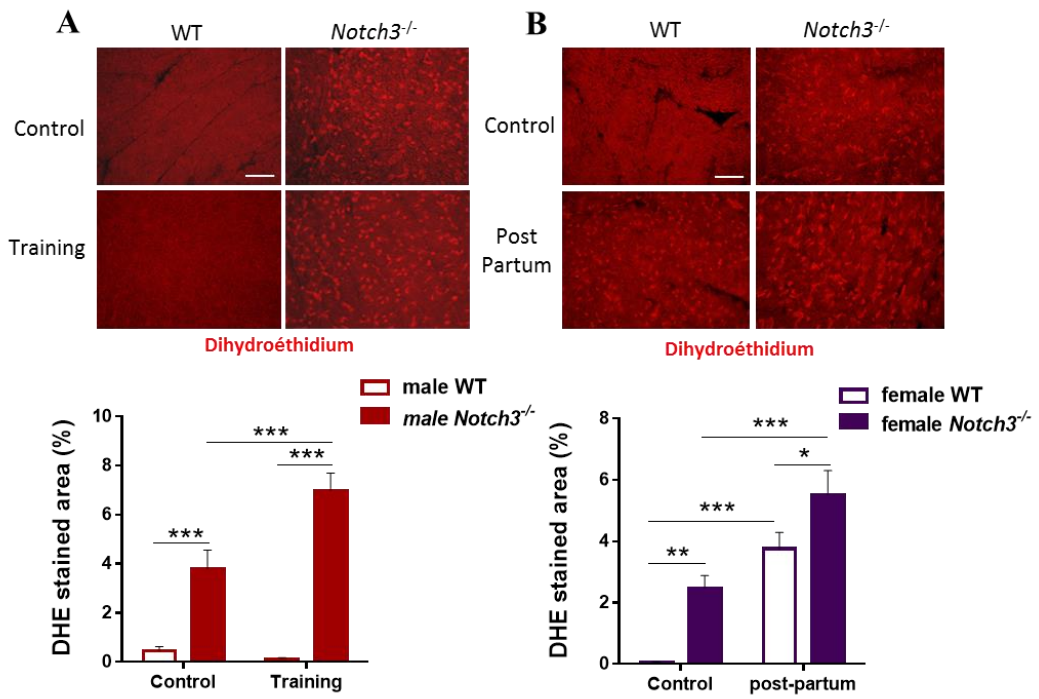


Figure 17 : Production d'anion superoxyde mesurée au Dihydroéthidium, dans les cœurs de souris WT ou *Notch3*$^{-/-}$ mâles (A) ou femelles (B) à l'état basal et après 5 semaines d'exercice physique ou une gestation, * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001.

Le niveau de production d'anion superoxyde au niveau cardiaque a été analysé par marquage au dihydroéthidium (DHE) chez les souris mâles et femelles en condition basale ou suite à l'entraînement physique ou la mise-bas (Figure 17). A l'état basal, nous observons un marquage DHE positif dans le cœur des souris *Notch3*$^{-/-}$ mâles et femelles contrairement aux souris WT, ce qui témoigne d'une production d'anion superoxyde plus importante chez les *Notch3*$^{-/-}$. L'entrainement physique induit une amplification de la production d'anion superoxyde chez les souris *Notch3*$^{-/-}$, alors qu'il est sans effets chez les WT (Figure 17A). Ces données suggèrent que, malgré le niveau modéré de l'entraînement physique comme en témoigne l'absence de ROS chez les souris WT, le cœur des souris *Notch3*$^{-/-}$ apparaît incapable d'équilibrer la production de ROS en réponse à un entrainement physique par une réponse anti-oxydante.

Chez les femelles en post-partum, on note une augmentation similaire de la production de ROS par rapport aux conditions basales qui est en accord avec les données de la littérature. Cette réponse associée aux altérations à l'état de base conduit à un niveau plus important chez les femelles *Notch3*$^{-/-}$ par rapport aux WT en post-partum. Comme la production accrue de ROS est connue pour induire des dommages cellulaires (dysfonction endothéliale, dysfonction contractiles…) (Chen and Zweier 2014), elle pourrait être impliquée dans la dysfonction cardiaque observée chez les femelles *Notch3*$^{-/-}$ en post-partum.

2.2.3.3. Analyses du compartiment microvasculaire

La raréfaction artériolaire observée chez les souris *Notch3*$^{-/-}$ mâles n'est pas compensée par 5 semaines d'exercice physique (Figure 18A). La densité capillaire cardiaque n'est pas modifiée chez les souris *Notch3*$^{-/-}$ (Figure 18C), alors qu'elle est augmentée chez les souris WT après entrainement comme décrit dans la littérature (Hudlicka, Brown et al. 1992). En revanche, les cœurs femelles *Notch3*$^{-/-}$ au stade post-partum présentent une augmentation de la densité capillaire (Figure 18D).

Ces résultats suggèrent une adaptation de la microcirculation à la surcharge de débit dans les cœurs des souris femelles qui est absente chez les mâles.

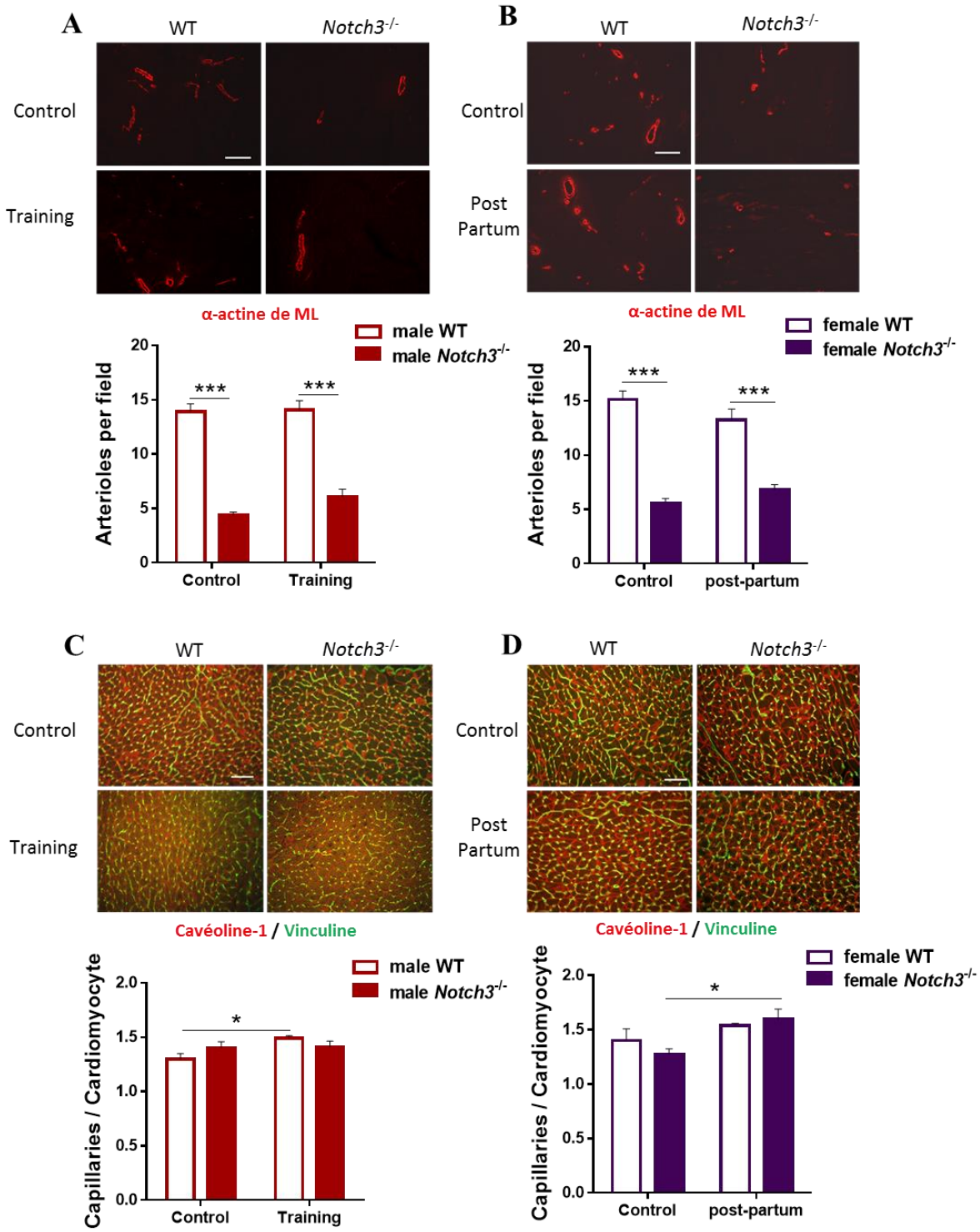


Figure 18 : Densités microvasculaires des souris WT et *Notch3*$^{-/-}$ mâles (panel de gauche) ou femelles (panel de droite) à l'état basal et après 5 semaines d'exercice physique ou une gestation. A-B Immunomarquage de l'α-actine de muscle lisse (rouge) dans les ventricules gauches de souris WT ou *Notch3*$^{-/-}$ mâles en réponse un entrainement physique (A) ou WT ou *Notch3*$^{-/-}$ femelles en réponse à la gestation (B) avec la mesure de la densité

artériolaire correspondant au nombre d'artérioles par unité de surface. **C-D** Double immunomarquage, en rouge par la cavéoline-1 des capillaires et en vert à la vinculine des cardiomyocytes, des coupes de VG des souris WT et Notch3$^{-/-}$ mâles en réponse un entrainement physique (C) ou WT ou *Notch3*$^{-/-}$ femelles en réponse à la gestation (D) et quantification de densité capillaire relative.* p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001.

2.2.3.4. Analyses du compartiment microvasculaire

Au vu des différences d'adaptation du réseau capillaire dans les cœurs *Notch3*$^{-/-}$ mâles et femelles en réponse à une surcharge de débit (respectivement entraînement et gestation), nous avons cherché à savoir si des variations d'expression des éléments des voies angiogéniques/anti-angiogéniques pouvaient en être à l'origine. Nous avons ainsi analysé l'expression des transcrits de la voie angiogénique du VEGF (Figure 19).

Après 5 semaines d'exercice physique, le transcrit *VEGFA* est augmenté dans les cœurs de souris mâles WT comme attendu (Amaral et al. 2001), alors qu'il demeure inchangé dans le myocarde des souris *Notch3*$^{-/-}$. En revanche, le transcrit du récepteur soluble anti-angiogénique de VEGFR1, le *sFLT1*, est induit dans les cœurs de souris *Notch3*$^{-/-}$ en réponse à l'entraînement physique, signe d'une balance en faveur d'une situation anti-angiogénique dans le cœur de ces souris. Concernant les souris femelles, nous ne montrons pas de différence d'expression du *VEGFA* au stade post-partum dans les 2 souches de souris. En revanche, alors que les cœurs des femelles WT au stade post-partum sont caractérisés par l'augmentation du *VEGFR1* et *sFLT1*, le niveau de ces transcrits n'est pas augmenté chez les femelles *Notch3*$^{-/-}$. L'augmentation d'expression des ARNm codant pour les formes membranaires et solubles du VEGFR1 lors du post-partum chez les WT est en accord avec les données de la littérature. En effet, la fin de grossesse et le post-partum se caractérisent par un

environnement anti-angiogénique au niveau cardiaque : retour à un niveau contrôle des facteurs angiogéniques (Chung et al. 2013) et augmentation des facteurs anti-angiogéniques (sFLT1/sVEGFR1) (Patten et al. 2012). Cet état diffère des stades précoce et intermédiaire de la grossesse où les voies angiogéniques (VEGF, angiopoïétine et FGF-2) sont stimulées (Hilfiker-Kleiner et al. 2007; Umar, Nadadur et al. 2012). De façon surprenante, l'induction de *VEGFR1* et *sFLT1* n'est pas observée dans les cœurs femelles *Notch3*$^{-/-}$ en post-partum. Cette dérégulation pourrait expliquer la réponse angiogénique observée.

L'ensemble de ces résultats montre des réponses différentes de l'expression des marqueurs angiogéniques/anti-angiogéniques du VEGFA/VEGFR dans les cœurs des souris *Notch3*$^{-/-}$ en réponse à une surcharge de débit. Ces données soutiennent les résultats morphométriques de densité capillaire.

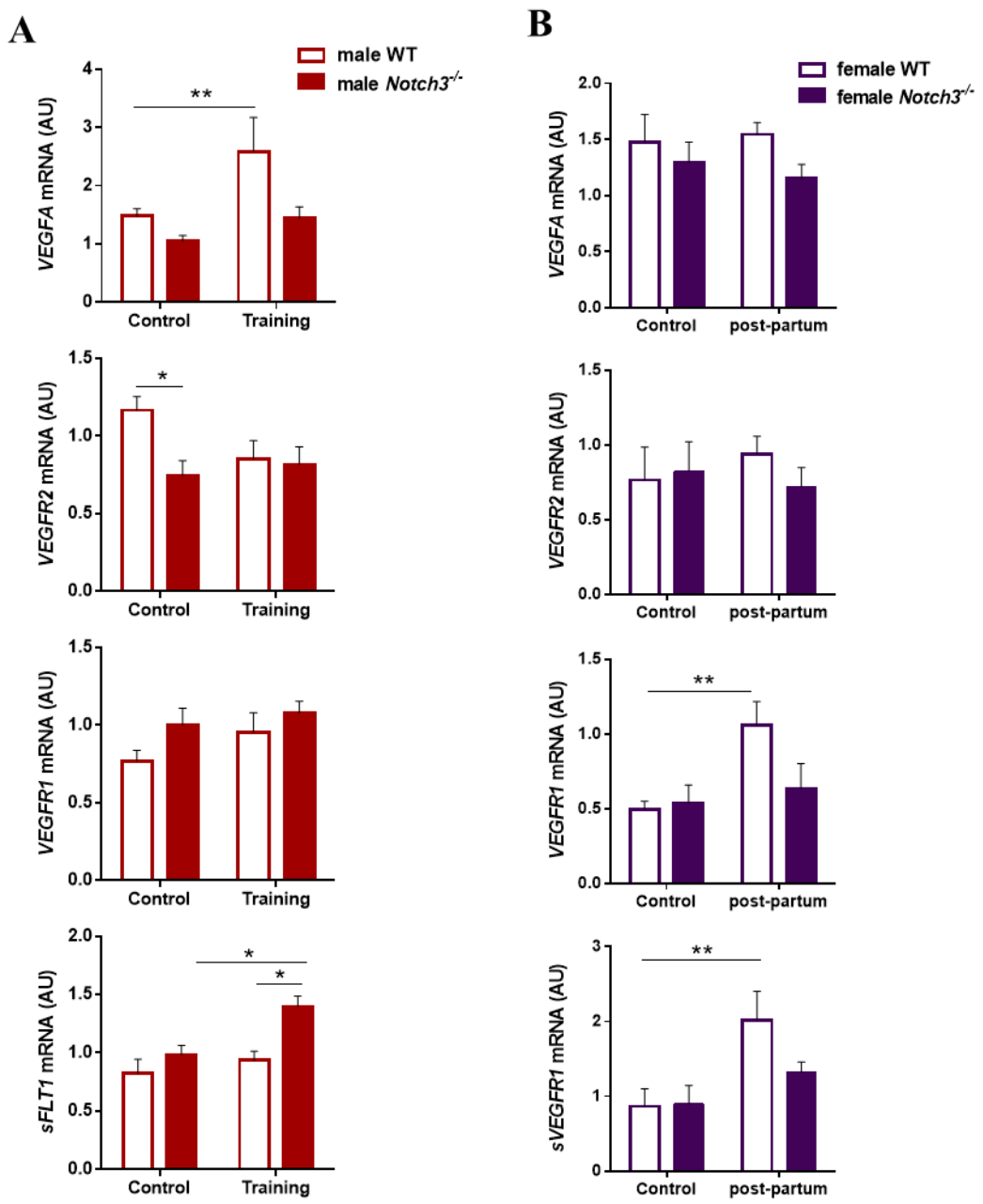


Figure 19 : Expression des transcrits du VEGFA et des récepteurs VEGFR1, sVEGFR1 et VEGFR2 dans les cœurs de souris WT et *Notch3*$^{-/-}$ mâles (A) ou femelles (B) à l'état basal et après 5 semaines d'exercice physique ou une gestation par RT-PCR. * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001.

2.3. Conclusions

Aux plans expérimental et clinique, il est établi que l'entrainement physique a un effet angiogénique au niveau des muscles squelettiques et cardiaque chez l'adulte. Ainsi, la réadaptation par l'entrainement physique a été montrée très bénéfique chez les patients atteints de pathologies cardiovasculaires et en particulier d'insuffisance cardiaque. Les modèles murins avec remodelage cardiaque physiologique ont permis de décrypter certains des mécanismes mis en jeu tels que l'activation des voies AKT et IGF1 conduisant à l'hypertrophie des myocytes avec mitochondriogenèse (Ventura-Clapier, Mettauer et al. 2007) et l'augmentation de la densité capillaire via VEGF ou IL-6 (Ferrara, Gerber et al. 2003; Wei et al. 2003). Les souris mâles *Notch3*$^{-/-}$ présentant, à l'état basal, une cardiomyopathie et des défauts de l'arbre coronaire. Nous nous sommes demandés si un entrainement physique modéré serait bénéfique ou délétère au plan de la fonction cardiaque de ces souris. Nous montrons que les mâles *Notch3*$^{-/-}$ ne présentent pas de signes de réponse angiogénique du réseau microvasculaire après 5 semaines d'exercice physique. Toutefois, cet entrainement a un effet positif sur le phénotype cardiaque avec une réduction du degré d'hypertrophie, suggérant une adaptation du myocarde.

En parallèle, l'analyse du phénotype cardiaque des souris *Notch3*$^{-/-}$ femelles montre un défaut artériolaire similaire aux mâles de même génotype Cependant, le retentissement cardiaque est moindre avec une absence d'hypertrophie ventriculaire suggérant une meilleure adaptation. En outre, le fait que les souris femelles *Notch3*$^{-/-}$ puissent mener à terme les grossesses, laissait penser qu'elles étaient capables de s'adapter à une surcharge de débit. L'analyse des cœurs en post-partum primipare révèle une adaptation de la densité capillaire chez ces souris. La situation cardiaque en post-partum se caractérise par un environnement anti-angiogénique, notamment via l'inactivation de la voie VEGF, permettant la régression de

l'hypertrophie physiologique, mais ces voies ne semblent pas être activées dans le cœur des femelles *Notch3*$^{-/-}$.

L'ensemble de ces résultats souligne l'importance de la voie Notch3 dans la capacité d'adaptation des coronaires à des changements hémodynamiques.

Nous montrons, dans cette partie, qu'à l'état basal les femelles *Notch3*$^{-/-}$ présentent au niveau cardiaque le même défaut artériolaire que les mâles impliquant une production de ROS accrue. Cependant, l'absence d'hypertrophie cardiaque chez les femelles suggère que ces altérations ont peu d'impact fonctionnel à l'état de base. La surcharge de débit telle que celle imposée par l'entrainement physique entraîne une réponse angiogénique dans le myocarde des souris WT, via l'induction de la voie *VEGFA* comme attendu (Amaral, Papanek et al. 2001), mais pas chez les souris *Notch3*$^{-/-}$. Au contraire, l'entraînement chez ces animaux amplifie la production cardiaque de ROS suggérant un environnement hypoxique, tandis que l'induction du transcrit *sVEGFR1* serait en faveur d'un processus anti-angiogénique. Cependant, la réduction de l'hypertrophie ventriculaire est en faveur d'effets bénéfiques de l'entraînement modéré, mais les mécanismes mis en jeu sont encore inconnus. Les souris *Notch3*$^{-/-}$ femelles sont capables d'adapter leur microcirculation cardiaque à une surcharge de débit induite par la gestation comme en témoigne l'augmentation de la densité capillaire. En situation de post-partum immédiat, l'absence de réponse anti-angiogénique telle que l'induction de *VEGFR1* et *sVEGFR1*, détectée dans le cœur des souris WT, souligne les réponses cardiaques possiblement mal adaptées de ces animaux. Cette hypothèse est soutenue par la dysfonction cardiaque observée chez les souris *Notch3*$^{-/-}$ en post-partum, ainsi que la surproduction de ROS, ce qui laisse supposer la réponse capillaire adaptée est peut-être insuffisante pour palier à la raréfaction artériolaire observée chez ces souris.

IV. Discussion

Christos Chatziantoniou *et coll* (Boulos, Helle et al. 2011) avaient montré que l'invalidation de *Notch3* chez la souris induisait une mortalité précoce en réponse à une infusion d'Ang II. Ces analyses révélaient des atteintes cardiaques et rénales chez ces souris, mais les mécanismes mis en jeu n'étaient pas connus. Nous démontrons que l'activation de voie Notch3 est nécessaire au maintien de l'intégrité du système coronaire chez l'adulte mâle ou femelle. En revanche, les défauts structuraux observés conduisent à des phénotypes cardiaques différents selon le genre. Lors de situations pathologiques ou physiologiques, nous montrons que la répression de *Notch3* bloque la capacité des vaisseaux à s'adapter à une HTA conduisant vers l'insuffisance cardiaque. Cependant, l'entraînement physique modéré chez le mâle pourrait permettre une certaine réadaptation/prévention des complications cardiovasculaires.

1. La voie de signalisation de Notch3 sur le système vasculaire

Selon les données de la littérature, Notch3 est essentiellement connu pour son rôle dans la maturation postnatale des artères de résistance (Domenga, Fardoux et al. 2004). Les souris portant une invalidation de *Notch3* naissent avec des artères similaires à celles des souris WT. Cependant, la maturation de ces vaisseaux, qui survient au cours des 4 semaines suivant la naissance, n'a pas lieu en absence de *Notch3*. Il en résulte, à l'âge adulte, une altération de l'arbre vasculaire qui varie selon le territoire étudié avec un défaut de réactivité active (Boulos, Helle et al. 2011) et passive (Belin de Chantemele, Retailleau et al. 2008). Les souris *Notch3*$^{-/-}$ sont également caractérisées par une raréfaction artériolaire au niveau cérébral (Henshall, Keller et al. 2015) et de la rétine (Liu, Zhang et al. 2010). Nos travaux démontrent, pour la première fois, que le système coronaire de ces souris est également altéré et caractérisé par une moindre densité d'artérioles de profils α-SM actine positive. Ce résultat

pourrait refléter 2 phénomènes : 1- une diminution de la proportion d'artérioles différenciées/contractiles et/ou 2- une diminution du nombre d'artérioles. Cependant, la FN-EDA, marqueur du phénotype sécrétoire des CMLV, n'est pas détectée au niveau d'artérioles montrant l'absence de média dédifférenciée dans le cœur des souris *Notch3*$^{-/-}$, ce qui nous amène à soutenir l'hypothèse d'une raréfaction artériolaire chez ces souris.

De façon intéressante, le compartiment capillaire n'est pas atteint par l'absence de *Notch3,* ce qui confirme que les CMLV sont les cibles principales de Notch3 et non les cellules endothéliales ou les péricytes. Toutefois, il est connu que la voie Notch peut moduler de manière paradoxale l'angiogenèse, notamment tumorale (Thurston et al. 2007). En effet, il a été montré que l'inhibition de la voie Dll4/Notch augmente le nombre de vaisseaux tumoraux, mais de manière anarchique et non productive, ce qui résulte une diminution de la perfusion et une hypoxie conduisant à la régression de la tumeur (Noguera-Troise et al. 2006). Dans notre situation, nous ne connaissons pas le pourcentage de capillaires fonctionnels dans le cœur des souris *Notch3*$^{-/-}$. Pour analyser la perfusion capillaire, nous avions tenté de perfuser les vaisseaux avec de la lectine-TRITC des souris 5 min avant sacrifice et de faire un contre marquage à la cavéoline-1 pour définir la densité totale des capillaires. Nos analyses préliminaires des coupes de cœurs ne montraient pas de signal lectine dans certaines zones du myocarde (données non présentées), mais des difficultés techniques relatives au double marquage n'ont pas pu confirmer ces résultats. Une perspective à ce travail serait d'évaluer précisément la distribution fonctionnelle et anatomique de l'arbre vasculaire chez ces souris. Nous avons prévu de perfuser les coronaires avec un agent radio-opaque afin de mesurer le niveau des embranchements dans le cœur par système de micro-CT, appareil disponible sur le site de Lariboisière.

Une des limites de l'analyse des souris *Notch3*$^{-/-}$ est la difficulté à différencier les effets spécifiquement induits chez l'adulte des défauts secondaires au développement et/ou la

maturation des artères. Pour s'affranchir de ce problème, nous avons utilisé un modèle de souris avec invalidation inductible par le tamoxifène de la voie Notch dans les CMLV. Les souris Notch3$^{flox/flox}$, n'existant pas à notre connaissance, nous avons réprimé l'expression du facteur de transcription *RBPJκ* à l'âge de 4 semaines. Des études antérieures de l'équipe d'A. Joutel ont montré que l'activité de RBPJκ était principalement médiée par la voie Notch3 dans les artères de résistance (Monet et al. 2007) et que son invalidation dans les CMLV au stade post-natal phénocopiait les altérations vasculaires observées chez les souris *Notch3*$^{-/-}$ (Fouillade, Baron-Menguy et al. 2013). Cette proposition a cependant une limite : Notch1 et Notch2 sont également exprimés dans les CMLV, ce qui implique que l'on ne peut pas exclure des effets de l'invalidation de *RBPJκ* sur la signalisation des autres Notch dans les artères de plus gros calibre.

Néanmoins, l'invalidation de *RBPJκ* dans les CMLV à l'âge de 4 semaines, comme cela avait été montrée après la naissance (Fouillade, Baron-Menguy et al. 2013), induit une diminution spécifique de l'expression de *Notch3,* suggérant un effet prépondérant sur la signalisation de ce récepteur. Par ailleurs, les souris SM-*RBPκ*$^{-/-}$ présentent une moindre densité artériolaire au niveau cardiaque à l'âge de 15 semaines. Ces résultats indiquent que la voie Notch dans les CMLV n'est pas seulement requise au cours du développement et de la maturation, comme cela avait été proposé, mais est également nécessaire au maintien de l'intégrité de l'arbre coronaire à l'âge adulte. La voie Notch est connue pour médier des effets anti-apoptotiques, ce qui nous amène à proposer que la raréfaction artériolaire dans le cœur de ces souris pourrait être secondaire à une régression du système vasculaire. Nous n'avons pas observé d'activation des voies de l'apoptose dans les cœurs de souris SM-*RBPJκ*$^{-/-}$ (données non présentées), ce qui pourrait être dû au délai de 11 semaines entre le traitement au tamoxifène et l'analyse des cœurs. Il aurait fallu sacrifier les souris dans les jours suivant le

traitement tamoxifène pour analyser précisément les conséquences de l'inactivation de la voie Notch sur le système vasculaire et en particulier l'apoptose.

2. L'absence de la voie Notch3 impacte le cœur adulte

Un des faits majeurs de nos recherches est la mise en évidence des effets néfastes de l'absence de *Notch3* dans le cœur adulte. Nous montrons que la production cardiaque de ROS est augmentée dans le cœur des souris *Notch3*$^{-/-}$ et SM-*RBPJκ*$^{-/-}$. Cette production de ROS pourrait être secondaire au défaut artériolaire, cause d'un déséquilibre de la balance besoin/apport en oxygène dans le myocarde de ces souris. En effet, le cœur est particulièrement sensible à un déficit en oxygène du fait de la perfusion de ses coronaires en diastole, ce qui implique une autorégulation fonctionnelle du système vasculaire. Or, le défaut de tonus myogénique, observé dans les études précédentes, ainsi que la raréfaction artériolaire, que nous démontrons, peuvent être source d'une hypoxie chronique dans le cœur de ces souris et ainsi de la production de ROS (Duranteau et al. 1998).

Nos travaux montrent également que la durée d'invalidation de *Notch3* affecte le degré de sévérité des défauts cardiaques. En effet, les souris SM-*RBPJκ*$^{-/-}$ ne présentent pas de signes d'atteinte cardiaque, hormis la production de ROS, alors que les cœurs des souris *Notch3*$^{-/-}$ ont une fibrose interstitielle. Deux hypothèses peuvent expliquer le développement de cette fibrose cardiaque uniquement dans cette souche de souris:

1- Notch3 peut être exprimé dans les fibroblastes et inhiber la transition fibroblaste-myofibroblaste profibrosante ainsi que la fibrose induite par le TGF-β (Zhang et al. 2015). Or, chez les souris SM-RBPJκ, l'invalidation du *RBPJκ* ne peut pas affecter

le (myo)fibroblaste du fait d'un promoteur SM-MHC inactif dans ces cellules, ce qui pourrait expliquer la divergence de résultat entre les deux souches murines.

2- L'effet indirect de Notch3 via la raréfaction artériolaire au cours de la croissance cardiaque ne peut être exclu, induisant hypoxie et stress oxydant, deux facteurs connus pour induire la fibrose. Cependant, il sera difficile de déterminer l'origine de la fibrose car il n'existe pas, à notre connaissance, de promoteur spécifique du fibroblaste.

Par ailleurs nous montrons que l'absence congénitale de *Notch3* est responsable d'une cardiopathie chez la souris mâle. Cette cardiopathie se caractérise par une susceptibilité au stress avec une mortalité accrue au cours des différentes procédures expérimentales (tubes de contention au cours des mesures de pression, anesthésie). L'analyse *post-mortem* de ces souris, ne mettant pas en évidence des causes vasculaires de type anévrysmale, laisse supposer une cause cardiaque.

3. Notch3, implications respectives dans l'HTA et l'HTAP

L'étude précédente de Boulos *et al*, montrait le développement d'anasarque chez les souris *Notch3*$^{-/-}$ dans les 15 premiers jours d'une HTA induite par l'infusion d'Ang II, entrainant une mortalité importante. L'analyse *post-mortem* de ces souris pouvait suggérer une cause cardiaque (Boulos, Helle et al. 2011). Pour mieux comprendre les mécanismes à l'origine de cette réponse, nous avons suivi le même protocole d'HTA associant infusion d'Ang II et régime salé pendant 28 jours. Nos résultats confirment et étendent les observations de Boulos *et al*. Dès 6 jours d'infusion d'Ang II, les souris *Notch3*$^{-/-}$, bien que moins hypertendues, présentent une diminution de la fraction de raccourcissement, signe de dysfonction systolique qui peut être associé au développement d'une anasarque et une

mortalité prématurée. Fait intéressant de cette étude, les souris invalidées pour *RBPJκ* dans les CMLV développent également une dysfonction systolique sévère dès 6 jours après l'induction de l'HTA par l'Ang II. Cette insuffisance cardiaque s'accompagne fréquemment du développement d'anasarque/congestion et d'une mortalité. La combinaison de ces modèles d'invalidation génétique permanent ou induit permet ainsi de conclure que la dysfonction cardiaque des souris *Notch3*$^{-/-}$ est le reflet de l'importance de cette voie de signalisation dans le système cardiovasculaire à l'âge adulte et non d'un défaut développemental lié à l'absence de ce récepteur.

L'analyse du compartiment vasculaire dans les différents modèles de souris nous a permis de montrer les défauts des réponses artérielles à l'HTA en absence de la voie Notch3. Ces altérations se caractérisent par l'absence d'hypertrophie de la média associée à une aggravation du phénotype sécrétoire des CMLV. Le cœur des souris *Notch3*$^{-/-}$ présente une moindre densité capillaire que leurs contrôles après 28 jours d'HTA, ainsi qu'une altération de l'expression de la voie du VEGF (Schéma en Figure 20). Ces données soulignent l'importance de l'adaptation vasculaire dans les réponses cardiaques à une surcharge de pression. En effet, il est largement établi que l'augmentation de la pression artérielle est responsable d'un remodelage vasculaire associant hypertrophie et/ou hyperplasie des CMLV (Schiffrin 2012). Or ce phénomène contribue à l'augmentation des résistances périphériques et donc aux effets délétères de l'HTA. Ce cas de défauts de la voie Notch3, nous permet de démontrer que l'absence d'hypertrophie de la média est également une cause d'inadaptation du cœur face à une surcharge de pression.

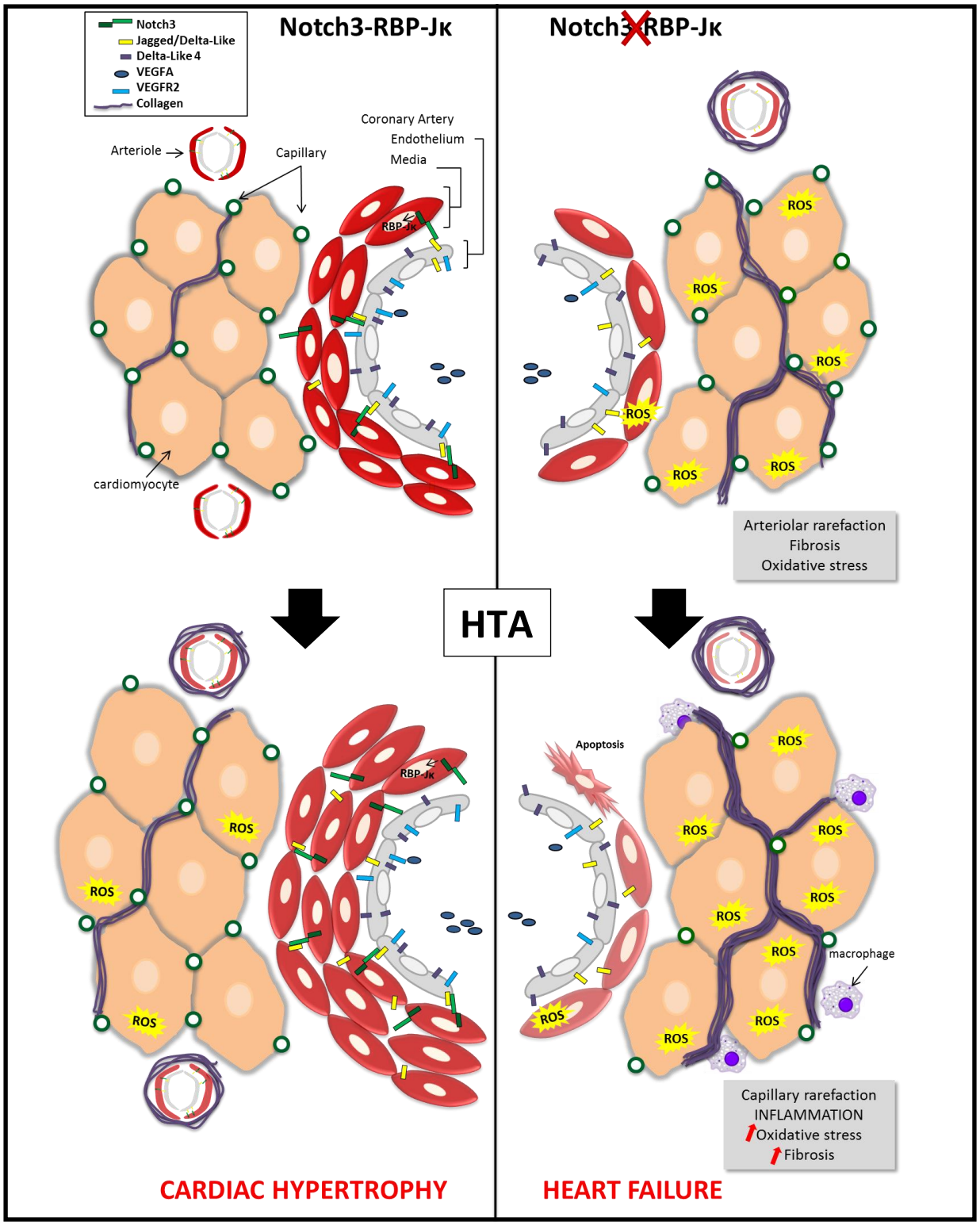


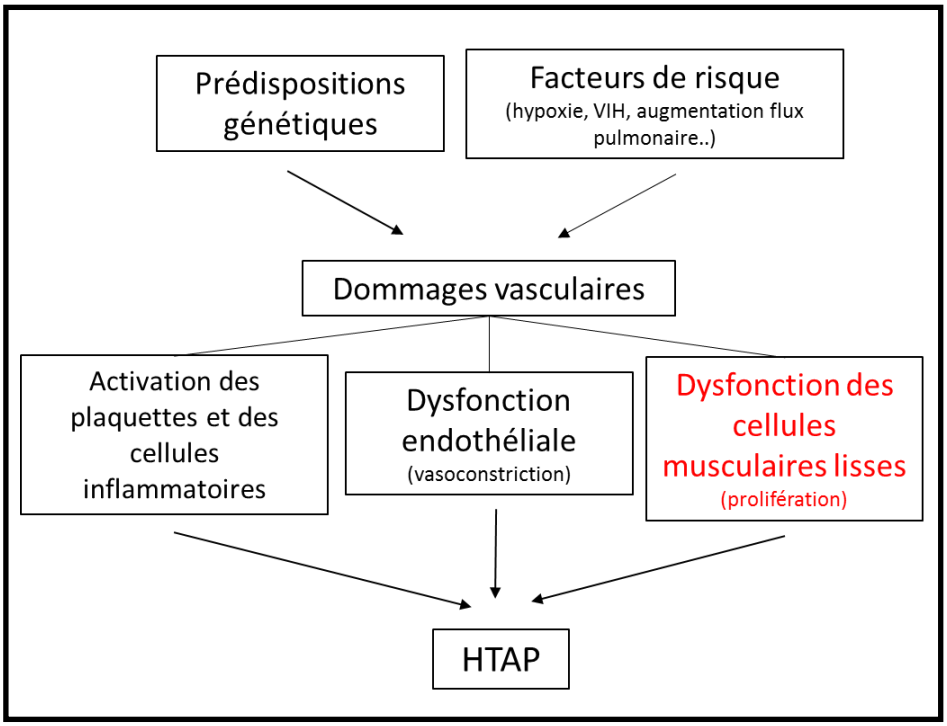
Figure 20 : Schéma récapitulatif des effets délétères induits par l'HTA en absence de la voie Notch3/RBPJκ dans les CMLV

Ces données contrastent avec celles faites dans un contexte d'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP). En effet Li *et al.* ont démontré que l'activation de la voie signalisation de Notch3 était délétère lors du développement de l'HTAP via l'effet de croissance des CMLV (Li, Zhang et al. 2009). Les souris *Notch3*$^{-/-}$ ne développent pas d'HTAP en réponse à l'hypoxie ou l'injection de monocrotaline.

Les différentes conséquences de l'absence de signalisation Notch3 dans le contexte de l'HTA et de l'HTAP s'expliquent par l'implication différente du réseau artériel dans la physiopathologie de ces maladies (cf. Figure 21). Dans le cas de l'HTAP, l'hypoxie induit la prolifération des CMLV associée à une vasoconstriction des artères pulmonaires, ce qui entraîne l'augmentation des résistances pulmonaires. Cette augmentation de résistance est la cause de l'HTAP qui peut ensuite entraîner une insuffisance cardiaque droite. En inhibant la voie Notch3, et donc la prolifération des CMLV, on prévient le développement de l'HTAP. Dans le cas de l'HTA, notamment liée à l'augmentation d'Ang II, une vasoconstriction est également exercée sur les vaisseaux. Les souris *Notch3*$^{-/-}$ répondent plus modérément à ce stimulus vasoconstricteur que leurs homologues WT en augmentant de façon moindre leur pression artérielle, ce qui révèle une moindre capacité de vasoconstriction des CMLV. L'hypertrophie de la média, induite par l'HTA et médiée par la voie Notch3, est une réponse adaptée à la surcharge de pression. En inhibant le développement de l'hypertrophie de la média sans abaisser la pression artérielle, l'absence d'adaptation du système cardiovasculaire à ces nouvelles conditions de charges hémodynamiques conduit rapidement à l'insuffisance cardiaque. Il est à noter que l'anasarque et la décompensation cardiaque des deux souches de souris avec défaut de la voie Notch3 surviennent entre le 6ème et 8ème jour d'HTA, ce qui correspondait à la transition entre la phase exponentielle de développement et la phase de stabilisation de pression artérielle, soit la période où le système cardiovasculaire se remodèle activement pour permettre la phase dite adaptée.

Nos résultats amènent une question : quelle est la cause de l'anasarque ? 1- est-elle le signe d'une décompensation cardiaque globale et sévère 2-est-elle en partie reliée à l'augmentation de perméabilité vasculaire qui entrainerait une insuffisance cardiaque. La voie Notch3 est impliquée dans l'intégrité structurelle des artères via l'inactivation des voies de l'apoptose dans les CMLV (Henshall, Keller et al. 2015), observations que nous confirmons chez les souris *Notch3*$^{-/-}$ après 28 jours d'HTA (article 1). Pour infirmer ou affirmer un trouble primitif de perméabilité, il serait nécessaire de mesurer la concentration protéique des œdèmes afin de déterminer l'origine de type transsudat (faible teneur en protéines car secondaire à l'IC) exsudat (forte teneur en protéines car liée à un trouble de perméabilité vasculaire). Toutefois, l'analyse échographique, qui révèle une dysfonction cardiaque sévère avec diminutions de la FR et du débit cardiaque chez les souris SM-*RBPJκ*$^{-/-}$ avant les signes d'anasarque, nous amène à proposer que la défaillance cardiaque est le facteur initial. Un point reste encore à éclaircir: l'élément déclencheur de la défaillance cardiaque aiguë. En effet, alors que toutes les souris *Notch3*$^{-/-}$ et SM-*RBPJκ*$^{-/-}$ présentent une diminution de FR en réponse à l'HTA, seule une partie d'entre elles développeront une anasarque. Les analyses du myocarde de ces souris montrent un défaut majeur de la signalisation angiogénique du VEGF. Il serait intéressant d'explorer la réserve de coronaire de ces souris par IRM, afin de déterminer si un défaut de réserve serait ou non corrélé à la gravité du phénotype cardiaque, comme observé chez les patients avec insuffisance cardiaque (Tsagalou et al. 2008).

Par ailleurs, la poursuite de la compréhension du rôle de la voie Notch3 se fera par l'intermédiaire d'un modèle de souris surexprimant le N3ICD dans les CMLV, actuellement en élevage au sein de notre animalerie. Après avoir induit la surexpression de la voie Notch3 à l'âge de 4 semaines, nous analyserons l'impact sur le système cardiovasculaire, ainsi que son effet sur la capacité du cœur à s'adapter à l'HTA.



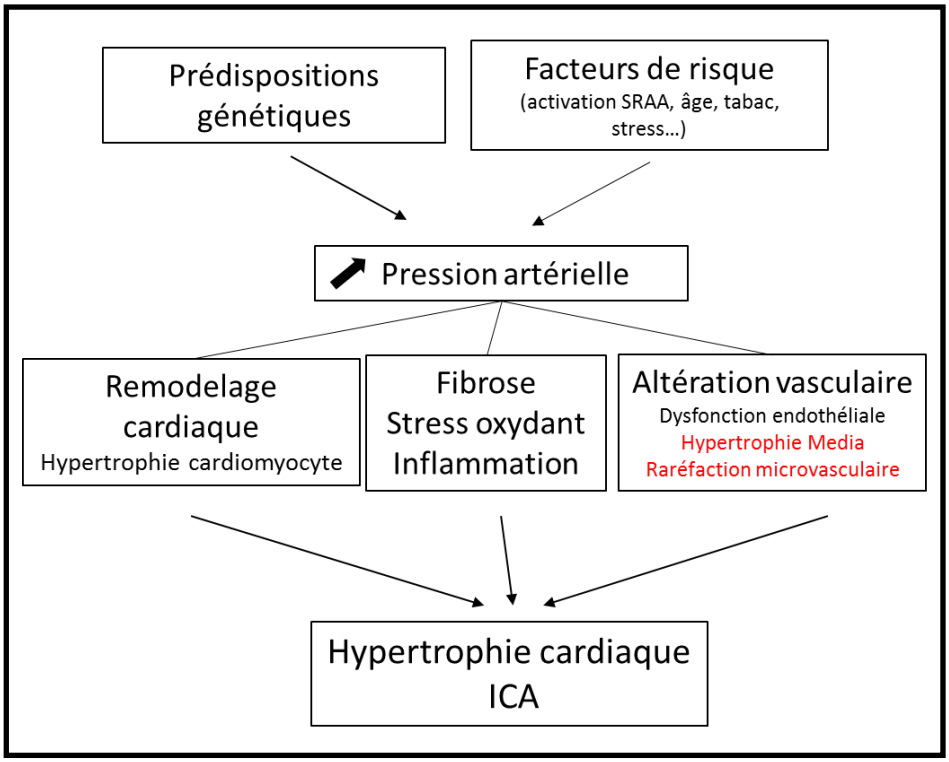


Figure 21 : physiopathologie de l'HTAP (haut) et de l'HTA (bas), montrant l'implication du réseau vasculaire à des stades différents de la maladie.

4. Cœur *Notch3*$^{-/-}$ et réadaptation à l'effort ?

Pour mieux comprendre le rôle de la voie Notch3 au niveau du myocarde lors du développement de hypertrophie cardiaque, nous avons choisi de déterminer les effets d'un entraînement physique sur le cœur pathologique des souris *Notch3*$^{-/-}$. L'exercice physique est connu pour induire une angiogenèse au niveau cardiaque (Crisman et al. 1985) et contribuer à une croissance physiologique du cœur. Ainsi, la réadaptation par entraînement physique modéré a été montrée bénéfique chez les patients souffrant de pathologies cardiaques (Tabet, Meurin et al. 2009; Aslanger, Assous et al. 2015). Toutefois, l'analyse sur modèles murins nuance le caractère bénéfique de l'exercice dans la réadaptation. La majorité des études ont montré que l'exercice physique améliorait la fonction cardiaque altérée par une HTA systémique (Chicco et al. 2008; Libonati et al. 2011) ou un stress β-adrénergique (Frederico et al. 2009). Cette action serait liée à la stimulation de la eNOS, la réduction de la fibrose ou du stress oxydant, et au métabolisme énergétique (Ventura-Clapier 2009). En revanche, il n'aurait pas d'effet sur la fonction cardiaque en cas de sténose aortique (van Deel et al. 2011).

Les souris *Notch3*$^{-/-}$ présentent, à l'état basal, une cardiopathie avec une sensibilité particulière au stress tel que l'HTA. C'est pourquoi nous avons choisi un protocole d'exercice physique modéré (3 fois par semaine pendant 5 semaines) qui est proche de celui de réadaptation en Cardiologie. Ce protocole n'était pas assez soutenu dans le temps pour induire une hypertrophie cardiaque chez la souris WT, mais a entraîné toutefois une réponse angiogénique. En revanche, les souris *Notch3*$^{-/-}$ sont caractérisées par une non-adaptation cardiovasculaire à la surcharge de débit induite par l'exercice physique. En effet, contrairement aux souris WT, les souris *Notch3*$^{-/-}$ ne présentent pas d'augmentation de la densité capillaire ni d'induction du *VEGFA*, un facteur angiogénique. Par ailleurs, l'induction de la forme soluble du récepteur « bloqueur » des effets VEGF, *sFLT-1*, suggère fortement

une activation des voies anti-angiogéniques. Ces observations seront à confirmer au niveau protéique (analyses par Western Blot). La conséquence des faibles densités capillaire et artériolaire chez les souris *Notch3*$^{-/-}$ est une inadéquation entre l'apport et les besoins en O_2 des muscles, en particulier cardiaque. Cette inadéquation, majorée lors de l'entraînement physique du fait d'une demande accrue en O_2, serait responsable de l'activation des mécanismes pro-oxydants et de l'augmentation des ROS.

Néanmoins, l'exercice physique semble avoir eu un effet bénéfique sur le cœur des souris *Notch3*$^{-/-}$ comme en témoigne la réduction de l'hypertrophie ventriculaire avec maintien de la fonction cardiaque. Cependant, les mécanismes impliqués ne sont pas encore identifiés. Deux hypothèses sont à vérifier : s'agit-il

1- d'une atrophie modérée des cardiomyocytes, si oui, quelles en sont les voies de signalisation mises en jeu ?
2- d'une réduction de la fibrose cardiaque via l'activation des métalloprotéases comme observés dans d'autres études (Rossoni et al. 2011).

Toutefois, l'absence de réponse angiogénique et artérielle à la surcharge de débit confirme la nécessité d'un entraînement physique de type modéré lors de défaut de la signalisation *Notch3*$^{-/-}$ pour permettre une adaptation cardiaque.

5. Notch3, effet cardiaque différentiel selon le genre?

Un des objectifs de nos recherches était également de définir les conséquences de l'invalidation du gène de *Notch3* dans le cœur de souris femelles, ainsi que dans un autre modèle de surcharge de débit, celui induit par la gestation.

Nos résultats montrent que les femelles *Notch3*$^{-/-}$ ne présentent pas d'hypertrophie cardiaque significative en dépit de la raréfaction artériolaire et la production accrue de ROS. Par ailleurs, contrairement aux mâles, les cœurs des femelles *Notch3*$^{-/-}$ ne présentent pas de fibrose interstitielle. L'ensemble de ces données indique une meilleure adaptation cardiaque chez les femelles face à l'absence de la voie *Notch3*. Il est établi que les œstrogènes ont un rôle clé dans la cardioprotection lors de l'ischémie/reperfusion (Zhai et al. 2000; Fang et al. 2001; Wang et al. 2008). La raréfaction artériolaire associée à une production accrue des ROS dans le cœur des femelles *Notch3*$^{-/-}$ suggère, comme chez les mâles *Notch3*$^{-/-}$, un déséquilibre de la balance apport/besoin en O_2, donc une possible hypoxie chronique à l'état basal.

En situation de post-partum immédiat, les souris *Notch3*$^{-/-}$ présentent une dysfonction cardiaque, suggérant que Notch3 est une voie de signalisation nécessaire à l'adaptation cardiovasculaire lors de la grossesse. Cependant, aucun signe marquant de remodelage pathologique n'est observé comme en témoigne l'absence d'hypertrophie ou de fibrose cardiaque. Des analyses à plus long terme après la mise bas, incluant des explorations du compartiment cardiomyocytaire, permettraient peut être de rechercher des lésions cardiaques et d'apporter quelques éléments de compréhensions.

L'analyse du compartiment microvasculaire révèle une capacité angiogénique dans le cœur des souris *Notch3*$^{-/-}$. Ainsi, l'analyse du compartiment vasculaire met en évidence une augmentation de la densité capillaire dans les cœurs *Notch3*$^{-/-}$ à la phase post-partum. Une réponse angiogénique cardiaque est classiquement observée dans les conditions de croissance physiologique induite par la grossesse chez la femme. L'augmentation de la densité artériolaire et capillaire, lors de la grossesse, permet au cœur de s'adapter à l'augmentation du débit. Cette réponse angiogénique est médiée les voies du VEGF notamment (Hilfiker-Kleiner, Kaminski et al. 2007; Umar, Nadadur et al. 2012). A l'inverse, les phases du péri- et du post-partum sont caractérisées par l'arrêt des voies angiogénique et protrophique liées à

l'activation des voies anti-angiogéniques et anti-trophiques (Patten, Rana et al. 2012) qui permettent au cœur de revenir à son état initial. Ainsi, l'augmentation dans les cœurs WT à la phase post-partum de l'expression des ARNm codant *VEGFR1* et *sFLT1/sVEGFR1* est en complet accord avec ces données, puisque la liaison du VEGFA à ce récepteur contrecarre la voie angiogénique du VEGFA se liant au VEGFR2/FLK1 au niveau des tissus cibles. De façon surprenante, dans le cœur des femelles *Notch3*$^{-/-}$ en post-partum l'expression des isoformes membranaire et soluble du récepteur *VEGFR1* n'est pas observée. L'absence de régulation du récepteur anti-angiogénique, *VEGFR1*, que ce soit sa forme soluble ou membranaire pourrait être un élément important de la réponse angiogénique observée dans les cœurs femelles *Notch3*$^{-/-}$ en post-partum, car il n'y a pas de modulation de l'expression quant aux autres éléments de cette voie angiogénique (*PLGF*, *VEGFA*, *VEGFR2*). Pour mieux comprendre les mécanismes sous-jacents de cette induction d'angiogenèse, il serait intéressant d'analyser le phénotype cardiaque à différents temps de gestation.

Bien que la grossesse soit un modèle de remodelage physiologique par surcharge de débit comme l'exercice physique, les stimuli hormonaux entre ces modèles sont différents. Les changements de concentration en hormones stéroïdes (progestérone, oestradiol) sont connus depuis longtemps (Virgo and Bellward 1974; McCormack and Strauss 1975) et sont impliqués dans la croissance cardiaque lors de la grossesse (Chung, Yeung et al. 2012). La gestation s'accompagne aussi d'une augmentation de sécrétion de relaxine par le corpus luteum, hormone qui diminue les résistances artérielles périphériques et dont la concentration plasmatique est maximale en fin de grossesse (Conrad 2011). Pour s'affranchir de l'influence hormonale liée à la gestation, il sera nécessaire de compléter l'exploration du phénotype cardiaque des femelles en les soumettant au même programme d'entrainement physique que les mâles. Cette comparaison permettra ainsi de déterminer si l'adaptation cardiaque des

femelles en absence de la voie *Notch3* observée lors de la grossesse est liée à un effet du genre ou du modèle d'hypertrophie cardiaque.

6. Et au le plan clinique ?

Chez l'Homme, des mutations stéréotypées de NOTCH3 sont connues pour induire la maladie cérébrale CADASIL, maladie touchant les petites artères de résistance. Bien que les symptômes identifiés soient quasi-exclusivement cérébraux, quelques études ont montré que les malades atteints de CADASIL présentaient une forte incidence de mort subite (Lesnik Oberstein, Jukema et al. 2003) corrélée à une augmentation de la variabilité du QT (Piccirillo, Magri et al. 2008), suggérant une possible atteinte cardiaque. Nous pouvons donc mettre en parallèle ces observations cliniques avec celles faites dans ce travail impliquant les souris *Notch3*$^{-/-}$. Toutefois il est important de souligner que les souris *Notch3*$^{-/-}$ ne représentent pas un modèle de CADASIL, maladie secondaire à une mutation du gène et non une délétion.

Au cours de ces recherches, des souris *Notch3* hétérozygotes ont été implantées par une mini-pompe d'Ang II (à la suite d'erreur de génotypage). Cependant, cette erreur a montré que le statut d'hétérozygotie pour *Notch3* peut suffire à induire une décompensation cardiaque sévère avec développement d'anasarque. Ces observations, plus proches de l'Homme dont les mutations sont rarement homozygotes, nous permettent de proposer que des mutations de *NOTCH3*, différentes de CADASIL, pourraient être à l'origine de cardiopathies congénitales capables de décompenser lors de modifications hémodynamiques.

Par ailleurs, l'implication de *Notch3* a été mise en évidence dans différentes pathologies humaines : HTAP (Li, Zhang et al. 2009), maladies rénales (El Machhour, Keuylian et al. 2015), cancers (Dang, Gazdar et al. 2000; Park, Li et al. 2006; Ozawa, Kazama

et al. 2014). Notch3 activerait la prolifération cellulaire dans ces pathologies faisant de Notch3 une cible thérapeutique potentielle. Nos résultats soulèvent ainsi la question quant aux effets secondaires cardiaques que pourrait avoir la répression de la voie Notch3 sur le système cardiovasculaire en cas de traitement anti-Notch3.

V. Bibliographie

Ahmadiasl, N., H. Najafipour, F. G. Soufi and A. Jafari (2012). "Effect of short- and long-term strength exercise on cardiac oxidative stress and performance in rat." **J Physiol Biochem 68**(1): 121-128.

Amaral, S. L., P. E. Papanek and A. S. Greene (2001). "Angiotensin II and VEGF are involved in angiogenesis induced by short-term exercise training." **Am J Physiol Heart Circ Physiol 281**(3): H1163-1169.

Artavanis-Tsakonas, S., M. D. Rand and R. J. Lake (1999). "Notch signaling: cell fate control and signal integration in development." **Science 284**(5415): 770-776.

Artigou, J. Y., S. f. d. cardiologie and J. J. Monsuez (2007). **Cardiologie et maladies vasculaires**, Elsevier Masson.

Aslanger, E., B. Assous, N. Bihry, F. Beauvais, D. Logeart and A. Cohen-Solal (2015). "Effects of Cardiopulmonary Exercise Rehabilitation on Left Ventricular Mechanical Efficiency and Ventricular-Arterial Coupling in Patients With Systolic Heart Failure." **J Am Heart Assoc 4**(10): e002084.

Assy, N., G. Spira, M. Paizi, L. Shenkar, Y. Kraizer, T. Cohen, G. Neufeld, B. Dabbah, R. Enat and Y. Baruch (1999). "Effect of vascular endothelial growth factor on hepatic regenerative activity following partial hepatectomy in rats." **J Hepatol 30**(5): 911-915.

Aubin, M. C., M. Carrier, Y. F. Shi, J. C. Tardif and L. P. Perrault (2006). "Role of probucol on endothelial dysfunction of epicardial coronary arteries associated with left ventricular hypertrophy." **J Cardiovasc Pharmacol 47**(5): 702-710.

Azibani, F., Y. Devaux, G. Coutance, S. Schlossarek, E. Polidano, L. Fazal, R. Merval, L. Carrier, A. C. Solal, C. Chatziantoniou, J. M. Launay, J. L. Samuel and C. Delcayre (2012). "Aldosterone inhibits the fetal program and increases hypertrophy in the heart of hypertensive mice." **PLoS One 7**(5): e38197.

Baker, J., J. P. Liu, E. J. Robertson and A. Efstratiadis (1993). "Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth." **Cell 75**(1): 73-82.

Bakker, E. N., E. T. van der Meulen, B. M. van den Berg, V. Everts, J. A. Spaan and E. VanBavel (2002). "Inward remodeling follows chronic vasoconstriction in isolated resistance arteries." **J Vasc Res 39**(1): 12-20.

Baudrimont, M., F. Dubas, A. Joutel, E. Tournier-Lasserve and M. G. Bousser (1993). "Autosomal dominant leukoencephalopathy and subcortical ischemic stroke. A clinicopathological study." **Stroke 24**(1): 122-125.

Belin de Chantemele, E. J., K. Retailleau, F. Pinaud, E. Vessieres, A. Bocquet, A. L. Guihot, B. Lemaire, V. Domenga, C. Baufreton, L. Loufrani, A. Joutel and D. Henrion (2008). "Notch3 is a major regulator of vascular tone in cerebral and tail resistance arteries." **Arterioscler Thromb Vasc Biol 28**(12): 2216-2224.

Bergmann, M., M. Ebke, Y. Yuan, W. Bruck, M. Mugler and G. Schwendemann (1996). "Cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (CADASIL): a morphological study of a German family." **Acta Neuropathol 92**(4): 341-350.

Berk, B. C. (2001). "Vascular smooth muscle growth: autocrine growth mechanisms." **Physiol Rev 81**(3): 999-1030.

Bernardo, B. C., K. L. Weeks, L. Pretorius and J. R. McMullen (2010). "Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: experimental findings and therapeutic strategies." **Pharmacol Ther 128**(1): 191-227.

Betsholtz, C. (2004). "Insight into the physiological functions of PDGF through genetic studies in mice." **Cytokine Growth Factor Rev 15**(4): 215-228.

Boccatonda, A., R. Tripaldi, G. Davi and F. Santilli (2016). "Oxidative Stress Modulation Through Habitual Physical Activity." **Curr Pharm Des 22**(24): 3648-3680.
Bohlen, H. G. (1986). "Localization of vascular resistance changes during hypertension." **Hypertension 8**(3): 181-183.
Boulanger, C. M. (1999). "Secondary endothelial dysfunction: hypertension and heart failure." **J Mol Cell Cardiol 31**(1): 39-49.
Boulos, N., F. Helle, J. C. Dussaule, S. Placier, P. Milliez, S. Djudjaj, D. Guerrot, A. Joutel, P. Ronco, J. J. Boffa and C. Chatziantoniou (2011). "Notch3 is essential for regulation of the renal vascular tone." **Hypertension 57**(6): 1176-1182.
Brasier, A. R., A. Recinos, 3rd and M. S. Eledrisi (2002). "Vascular inflammation and the renin-angiotensin system." **Arterioscler Thromb Vasc Biol 22**(8): 1257-1266.
Brassard, P., F. Amiri and E. L. Schiffrin (2005). "Combined angiotensin II type 1 and type 2 receptor blockade on vascular remodeling and matrix metalloproteinases in resistance arteries." **Hypertension 46**(3): 598-606.
Bray, S. J. (2006). "Notch signalling: a simple pathway becomes complex." **Nat Rev Mol Cell Biol 7**(9): 678-689.
Broten, T. P. and E. O. Feigl (1992). "Role of myocardial oxygen and carbon dioxide in coronary autoregulation." **Am J Physiol 262**(4 Pt 2): H1231-1237.
Brou, C., F. Logeat, N. Gupta, C. Bessia, O. LeBail, J. R. Doedens, A. Cumano, P. Roux, R. A. Black and A. Israel (2000). "A novel proteolytic cleavage involved in Notch signaling: the role of the disintegrin-metalloprotease TACE." **Mol Cell 5**(2): 207-216.
Burgess, M. L., J. Buggy, R. L. Price, F. L. Abel, L. Terracio, A. M. Samarel and T. K. Borg (1996). "Exercise- and hypertension-induced collagen changes are related to left ventricular function in rat hearts." **Am J Physiol 270**(1 Pt 2): H151-159.
Campos, A. H., W. Wang, M. J. Pollman and G. H. Gibbons (2002). "Determinants of Notch-3 receptor expression and signaling in vascular smooth muscle cells: implications in cell-cycle regulation." **Circ Res 91**(11): 999-1006.
Carmines, P. K., T. K. Morrison and L. G. Navar (1986). "Angiotensin II effects on microvascular diameters of in vitro blood-perfused juxtamedullary nephrons." **Am J Physiol 251**(4 Pt 2): F610-618.
Carneiro-Junior, M. A., J. F. Quintao-Junior, L. R. Drummond, V. N. Lavorato, F. R. Drummond, D. N. da Cunha, M. A. Amadeu, L. B. Felix, E. M. de Oliveira, J. S. Cruz, T. N. Primola-Gomes, J. G. Mill and A. J. Natali (2013). "The benefits of endurance training in cardiomyocyte function in hypertensive rats are reversed within four weeks of detraining." **J Mol Cell Cardiol 57**: 119-128.
Carr, A. N. and E. G. Kranias (2002). "Thyroid hormone regulation of calcium cycling proteins." **Thyroid 12**(6): 453-457.
Chabriat, H., K. Vahedi, M. T. Iba-Zizen, A. Joutel, A. Nibbio, T. G. Nagy, M. O. Krebs, J. Julien, B. Dubois, X. Ducrocq and et al. (1995). "Clinical spectrum of CADASIL: a study of 7 families. Cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy." **Lancet 346**(8980): 934-939.
Chen, Y. R. and J. L. Zweier (2014). "Cardiac mitochondria and reactive oxygen species generation." **Circ Res 114**(3): 524-537.
Chicco, A. J., S. A. McCune, C. A. Emter, G. C. Sparagna, M. L. Rees, D. A. Bolden, K. D. Marshall, R. C. Murphy and R. L. Moore (2008). "Low-intensity exercise training delays heart failure and improves survival in female hypertensive heart failure rats." **Hypertension 51**(4): 1096-1102.
Chida, A., M. Shintani, Y. Matsushita, H. Sato, T. Eitoku, T. Nakayama, Y. Furutani, E. Hayama, Y. Kawamura, K. Inai, S. Ohtsuki, T. Saji, S. Nonoyama and T. Nakanishi

(2014). "Mutations of NOTCH3 in childhood pulmonary arterial hypertension." **Mol Genet Genomic Med 2**(3): 229-239.
Chin, M. T., K. Maemura, S. Fukumoto, M. K. Jain, M. D. Layne, M. Watanabe, C. M. Hsieh and M. E. Lee (2000). "Cardiovascular basic helix loop helix factor 1, a novel transcriptional repressor expressed preferentially in the developing and adult cardiovascular system." **J Biol Chem 275**(9): 6381-6387.
Choi, J. H., J. T. Park, B. Davidson, P. J. Morin, M. Shih Ie and T. L. Wang (2008). "Jagged-1 and Notch3 juxtacrine loop regulates ovarian tumor growth and adhesion." **Cancer Res 68**(14): 5716-5723.
Chung, E., J. Heimiller and L. A. Leinwand (2012). "Distinct cardiac transcriptional profiles defining pregnancy and exercise." **PLoS One 7**(7): e42297.
Chung, E., F. Yeung and L. A. Leinwand (2012). "Akt and MAPK signaling mediate pregnancy-induced cardiac adaptation." **J Appl Physiol (1985) 112**(9): 1564-1575.
Chung, E., F. Yeung and L. A. Leinwand (2013). "Calcineurin activity is required for cardiac remodelling in pregnancy." **Cardiovasc Res 100**(3): 402-410.
Conrad, K. P. (2011). "Maternal vasodilation in pregnancy: the emerging role of relaxin." **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 301**(2): R267-275.
Crisman, R. P., B. Rittman and R. J. Tomanek (1985). "Exercise-induced myocardial capillary growth in the spontaneously hypertensive rat." **Microvasc Res 30**(2): 185-194.
Croquelois, A., A. A. Domenighetti, M. Nemir, M. Lepore, N. Rosenblatt-Velin, F. Radtke and T. Pedrazzini (2008). "Control of the adaptive response of the heart to stress via the Notch1 receptor pathway." **J Exp Med 205**(13): 3173-3185.
Crozatier, B. and R. Ventura-Clapier (2015). "Inhibition of hypertrophy, per se, may not be a good therapeutic strategy in ventricular pressure overload: other approaches could be more beneficial." **Circulation 131**(16): 1448-1457.
Cumurciuc, R., P. Henry, C. Gobron, E. Vicaut, M. G. Bousser, H. Chabriat and K. Vahedi (2006). "Electrocardiogram in cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy patients without any clinical evidence of coronary artery disease: a case-control study." **Stroke 37**(4): 1100-1102.
Curry, C. L., L. L. Reed, T. E. Golde, L. Miele, B. J. Nickoloff and K. E. Foreman (2005). "Gamma secretase inhibitor blocks Notch activation and induces apoptosis in Kaposi's sarcoma tumor cells." **Oncogene 24**(42): 6333-6344.
D'Souza, B., L. Meloty-Kapella and G. Weinmaster (2010). "Canonical and non-canonical Notch ligands." **Curr Top Dev Biol 92**: 73-129.
Damp, J., M. M. Givertz, M. Semigran, R. Alharethi, G. Ewald, G. M. Felker, B. Bozkurt, J. Boehmer, J. Haythe, H. Skopicki, K. Hanley-Yanez, J. Pisarcik, I. Halder, J. Gorcsan, 3rd, S. Rana, Z. Arany, J. D. Fett, D. M. McNamara and I. Investigators (2016). "Relaxin-2 and Soluble Flt1 Levels in Peripartum Cardiomyopathy: Results of the Multicenter IPAC Study." **JACC Heart Fail 4**(5): 380-388.
Dang, T. P., A. F. Gazdar, A. K. Virmani, T. Sepetavec, K. R. Hande, J. D. Minna, J. R. Roberts and D. P. Carbone (2000). "Chromosome 19 translocation, overexpression of Notch3, and human lung cancer." **J Natl Cancer Inst 92**(16): 1355-1357.
De Strooper, B., W. Annaert, P. Cupers, P. Saftig, K. Craessaerts, J. S. Mumm, E. H. Schroeter, V. Schrijvers, M. S. Wolfe, W. J. Ray, A. Goate and R. Kopan (1999). "A presenilin-1-dependent gamma-secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain." **Nature 398**(6727): 518-522.
DeBosch, B., I. Treskov, T. S. Lupu, C. Weinheimer, A. Kovacs, M. Courtois and A. J. Muslin (2006). "Akt1 is required for physiological cardiac growth." **Circulation 113**(17): 2097-2104.

del Monte, G., J. C. Casanova, J. A. Guadix, D. MacGrogan, J. B. Burch, J. M. Perez-Pomares and J. L. de la Pompa (2011). "Differential Notch signaling in the epicardium is required for cardiac inflow development and coronary vessel morphogenesis." **Circ Res 108**(7): 824-836.

Desmond, D. W., J. T. Moroney, T. Lynch, S. Chan, S. S. Chin and J. P. Mohr (1999). "The natural history of CADASIL: a pooled analysis of previously published cases." **Stroke 30**(6): 1230-1233.

Dichgans, M., M. Mayer, I. Uttner, R. Bruning, J. Muller-Hocker, G. Rungger, M. Ebke, T. Klockgether and T. Gasser (1998). "The phenotypic spectrum of CADASIL: clinical findings in 102 cases." **Ann Neurol 44**(5): 731-739.

Diffee, G. M. and E. Chung (2003). "Altered single cell force-velocity and power properties in exercise-trained rat myocardium." **J Appl Physiol (1985) 94**(5): 1941-1948.

Doi, H., T. Iso, H. Sato, M. Yamazaki, H. Matsui, T. Tanaka, I. Manabe, M. Arai, R. Nagai and M. Kurabayashi (2006). "Jagged1-selective notch signaling induces smooth muscle differentiation via a RBP-Jkappa-dependent pathway." **J Biol Chem 281**(39): 28555-28564.

Dole, W. P. (1987). "Autoregulation of the coronary circulation." **Prog Cardiovasc Dis 29**(4): 293-323.

Domenga, V., P. Fardoux, P. Lacombe, M. Monet, J. Maciazek, L. T. Krebs, B. Klonjkowski, E. Berrou, M. Mericskay, Z. Li, E. Tournier-Lasserve, T. Gridley and A. Joutel (2004). "Notch3 is required for arterial identity and maturation of vascular smooth muscle cells." **Genes Dev 18**(22): 2730-2735.

Dufraine, J., Y. Funahashi and J. Kitajewski (2008). "Notch signaling regulates tumor angiogenesis by diverse mechanisms." **Oncogene 27**(38): 5132-5137.

Dumont, O., L. Loufrani and D. Henrion (2007). "Key role of the NO-pathway and matrix metalloprotease-9 in high blood flow-induced remodeling of rat resistance arteries." **Arterioscler Thromb Vasc Biol 27**(2): 317-324.

Duranteau, J., N. S. Chandel, A. Kulisz, Z. Shao and P. T. Schumacker (1998). "Intracellular signaling by reactive oxygen species during hypoxia in cardiomyocytes." **J Biol Chem 273**(19): 11619-11624.

Eghbali, M., R. Deva, A. Alioua, T. Y. Minosyan, H. Ruan, Y. Wang, L. Toro and E. Stefani (2005). "Molecular and functional signature of heart hypertrophy during pregnancy." **Circ Res 96**(11): 1208-1216.

Eghbali, M., Y. Wang, L. Toro and E. Stefani (2006). "Heart hypertrophy during pregnancy: a better functioning heart?" **Trends Cardiovasc Med 16**(8): 285-291.

El Machhour, F., Z. Keuylian, P. Kavvadas, J. C. Dussaule and C. Chatziantoniou (2015). "Activation of Notch3 in Glomeruli Promotes the Development of Rapidly Progressive Renal Disease." **J Am Soc Nephrol 26**(7): 1561-1575.

Espira, L. and M. P. Czubryt (2009). "Emerging concepts in cardiac matrix biology." **Can J Physiol Pharmacol 87**(12): 996-1008.

Fang, T. C., Y. Yashiro-Ohtani, C. Del Bianco, D. M. Knoblock, S. C. Blacklow and W. S. Pear (2007). "Notch directly regulates Gata3 expression during T helper 2 cell differentiation." **Immunity 27**(1): 100-110.

Fang, Z., S. H. Carlson, Y. F. Chen, S. Oparil and J. M. Wyss (2001). "Estrogen depletion induces NaCl-sensitive hypertension in female spontaneously hypertensive rats." **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 281**(6): R1934-1939.

Feletou, M. and P. M. Vanhoutte (2004). "EDHF: new therapeutic targets?" **Pharmacol Res 49**(6): 565-580.

Feletou, M. and P. M. Vanhoutte (2006). "Endothelial dysfunction: a multifaceted disorder (The Wiggers Award Lecture)." **Am J Physiol Heart Circ Physiol 291**(3): H985-1002.

Ferrara, N., H. P. Gerber and J. LeCouter (2003). "The biology of VEGF and its receptors." **Nat Med 9**(6): 669-676.

Fischer, A., N. Schumacher, M. Maier, M. Sendtner and M. Gessler (2004). "The Notch target genes Hey1 and Hey2 are required for embryonic vascular development." **Genes Dev 18**(8): 901-911.

Folkman, J., E. Merler, C. Abernathy and G. Williams (1971). "Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis." **J Exp Med 133**(2): 275-288.

Fong, G. H., J. Rossant, M. Gertsenstein and M. L. Breitman (1995). "Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium." **Nature 376**(6535): 66-70.

Fouillade, C., C. Baron-Menguy, V. Domenga-Denier, C. Thibault, K. Takamiya, R. Huganir and A. Joutel (2013). "Transcriptome analysis for Notch3 target genes identifies Grip2 as a novel regulator of myogenic response in the cerebrovasculature." **Arterioscler Thromb Vasc Biol 33**(1): 76-86.

Francis, R., G. McGrath, J. Zhang, D. A. Ruddy, M. Sym, J. Apfeld, M. Nicoll, M. Maxwell, B. Hai, M. C. Ellis, A. L. Parks, W. Xu, J. Li, M. Gurney, R. L. Myers, C. S. Himes, R. Hiebsch, C. Ruble, J. S. Nye and D. Curtis (2002). "aph-1 and pen-2 are required for Notch pathway signaling, gamma-secretase cleavage of betaAPP, and presenilin protein accumulation." **Dev Cell 3**(1): 85-97.

Frederico, M. J., S. L. Justo, G. Da Luz, S. Da Silva, C. Medeiros, V. A. Barbosa, L. A. Silva, C. R. Boeck, R. A. De Pinho and C. T. De Souza (2009). "Exercise training provides cardioprotection via a reduction in reactive oxygen species in rats submitted to myocardial infarction induced by isoproterenol." **Free Radic Res 43**(10): 957-964.

Frey, N., H. A. Katus, E. N. Olson and J. A. Hill (2004). "Hypertrophy of the heart: a new therapeutic target?" **Circulation 109**(13): 1580-1589.

Gaine, S. P. and L. J. Rubin (1998). "Primary pulmonary hypertension." **Lancet 352**(9129): 719-725.

Gibbons, G. H. and V. J. Dzau (1994). "The emerging concept of vascular remodeling." **N Engl J Med 330**(20): 1431-1438.

Gielen, S., G. Schuler and V. Adams (2010). "Cardiovascular effects of exercise training: molecular mechanisms." **Circulation 122**(12): 1221-1238.

Gonzalez, A. M., J. C. Osorio, C. Manlhiot, D. Gruber, S. Homma and S. Mital (2007). "Hypertrophy signaling during peripartum cardiac remodeling." **Am J Physiol Heart Circ Physiol 293**(5): H3008-3013.

Grossman, W. and W. J. Paulus (2013). "Myocardial stress and hypertrophy: a complex interface between biophysics and cardiac remodeling." **J Clin Invest 123**(9): 3701-3703.

Gude, N. A., G. Emmanuel, W. Wu, C. T. Cottage, K. Fischer, P. Quijada, J. A. Muraski, R. Alvarez, M. Rubio, E. Schaefer and M. A. Sussman (2008). "Activation of Notch-mediated protective signaling in the myocardium." **Circ Res 102**(9): 1025-1035.

Guignabert, C. and P. Dorfmuller (2013). "Pathology and pathobiology of pulmonary hypertension." **Semin Respir Crit Care Med 34**(5): 551-559.

Han, H., K. Tanigaki, N. Yamamoto, K. Kuroda, M. Yoshimoto, T. Nakahata, K. Ikuta and T. Honjo (2002). "Inducible gene knockout of transcription factor recombination signal binding protein-J reveals its essential role in T versus B lineage decision." **Int Immunol 14**(6): 637-645.

Heiss, H. W., J. Barmeyer, K. Wink, G. Hell, F. J. Cerny, J. Keul and H. Reindell (1976). "Studies on the regulation of myocardial blood flow in man. I.: Training effects on blood flow and metabolism of the healthy heart at rest and during standardized heavy exercise." **Basic Res Cardiol 71**(6): 658-675.

Henderson, A. M., S. J. Wang, A. C. Taylor, M. Aitkenhead and C. C. Hughes (2001). "The basic helix-loop-helix transcription factor HESR1 regulates endothelial cell tube formation." **J Biol Chem 276**(9): 6169-6176.

Henshall, T. L., A. Keller, L. He, B. R. Johansson, E. Wallgard, E. Raschperger, M. A. Mae, S. Jin, C. Betsholtz and U. Lendahl (2015). "Notch3 is necessary for blood vessel integrity in the central nervous system." **Arterioscler Thromb Vasc Biol 35**(2): 409-420.

Hew, K. W. and K. A. Keller (2003). "Postnatal anatomical and functional development of the heart: a species comparison." **Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol 68**(4): 309-320.

Hilfiker-Kleiner, D., K. Kaminski, E. Podewski, T. Bonda, A. Schaefer, K. Sliwa, O. Forster, A. Quint, U. Landmesser, C. Doerries, M. Luchtefeld, V. Poli, M. D. Schneider, J. L. Balligand, F. Desjardins, A. Ansari, I. Struman, N. Q. Nguyen, N. H. Zschemisch, G. Klein, G. Heusch, R. Schulz, A. Hilfiker and H. Drexler (2007). "A cathepsin D-cleaved 16 kDa form of prolactin mediates postpartum cardiomyopathy." **Cell 128**(3): 589-600.

Hilgers, R. H., S. Bergaya, P. M. Schiffers, P. Meneton, C. M. Boulanger, D. Henrion, B. I. Levy and J. G. De Mey (2003). "Uterine artery structural and functional changes during pregnancy in tissue kallikrein-deficient mice." **Arterioscler Thromb Vasc Biol 23**(10): 1826-1832.

Hill, J. A. and E. N. Olson (2008). "Cardiac plasticity." **N Engl J Med 358**(13): 1370-1380.

Hoeper, M. M., H. J. Bogaard, R. Condliffe, R. Frantz, D. Khanna, M. Kurzyna, D. Langleben, A. Manes, T. Satoh, F. Torres, M. R. Wilkins and D. B. Badesch (2013). "Definitions and diagnosis of pulmonary hypertension." **J Am Coll Cardiol 62**(25 Suppl): D42-50.

Hofmann, J. J. and M. L. Iruela-Arispe (2007). "Notch signaling in blood vessels: who is talking to whom about what?" **Circ Res 100**(11): 1556-1568.

Honsho, S., S. Nishikawa, K. Amano, K. Zen, Y. Adachi, E. Kishita, A. Matsui, A. Katsume, S. Yamaguchi, K. Nishikawa, K. Isoda, D. W. Riches, S. Matoba, M. Okigaki and H. Matsubara (2009). "Pressure-mediated hypertrophy and mechanical stretch induces IL-1 release and subsequent IGF-1 generation to maintain compensative hypertrophy by affecting Akt and JNK pathways." **Circ Res 105**(11): 1149-1158.

Hu, Y., Y. Ye and M. E. Fortini (2002). "Nicastrin is required for gamma-secretase cleavage of the Drosophila Notch receptor." **Dev Cell 2**(1): 69-78.

Huang, A., Y. Wu, D. Sun, A. Koller and G. Kaley (2001). "Effect of estrogen on flow-induced dilation in NO deficiency: role of prostaglandins and EDHF." **J Appl Physiol (1985) 91**(6): 2561-2566.

Hudlicka, O., M. Brown and S. Egginton (1992). "Angiogenesis in skeletal and cardiac muscle." **Physiol Rev 72**(2): 369-417.

Ignarro, L. J. (1989). "Biological actions and properties of endothelium-derived nitric oxide formed and released from artery and vein." **Circ Res 65**(1): 1-21.

Ignarro, L. J., G. M. Buga, K. S. Wood, R. E. Byrns and G. Chaudhuri (1987). "Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide." **Proc Natl Acad Sci U S A 84**(24): 9265-9269.

Intengan, H. D. and E. L. Schiffrin (2001). "Vascular remodeling in hypertension: roles of apoptosis, inflammation, and fibrosis." **Hypertension 38**(3 Pt 2): 581-587.

Ishiko, A., A. Shimizu, E. Nagata, K. Takahashi, T. Tabira and N. Suzuki (2006). "Notch3 ectodomain is a major component of granular osmiophilic material (GOM) in CADASIL." **Acta Neuropathol 112**(3): 333-339.

Iso, T., L. Kedes and Y. Hamamori (2003). "HES and HERP families: multiple effectors of the Notch signaling pathway." **J Cell Physiol 194**(3): 237-255.

Iso, T., T. Maeno, Y. Oike, M. Yamazaki, H. Doi, M. Arai and M. Kurabayashi (2006). "Dll4-selective Notch signaling induces ephrinB2 gene expression in endothelial cells." **Biochem Biophys Res Commun 341**(3): 708-714.

Janz, K. F., J. D. Dawson and L. T. Mahoney (2000). "Predicting heart growth during puberty: The Muscatine Study." **Pediatrics 105**(5): E63.

Jin, H., R. Yang, W. Li, H. Lu, A. M. Ryan, A. K. Ogasawara, J. Van Peborgh and N. F. Paoni (2000). "Effects of exercise training on cardiac function, gene expression, and apoptosis in rats." **Am J Physiol Heart Circ Physiol 279**(6): H2994-3002.

Jin, S., E. M. Hansson, S. Tikka, F. Lanner, C. Sahlgren, F. Farnebo, M. Baumann, H. Kalimo and U. Lendahl (2008). "Notch signaling regulates platelet-derived growth factor receptor-beta expression in vascular smooth muscle cells." **Circ Res 102**(12): 1483-1491.

Johnson, P. C. (1986). "Autoregulation of blood flow." **Circ Res 59**(5): 483-495.

Joutel, A. (2011). "Pathogenesis of CADASIL: transgenic and knock-out mice to probe function and dysfunction of the mutated gene, Notch3, in the cerebrovasculature." **Bioessays 33**(1): 73-80.

Joutel, A., C. Corpechot, A. Ducros, K. Vahedi, H. Chabriat, P. Mouton, S. Alamowitch, V. Domenga, M. Cecillion, E. Marechal, J. Maciazek, C. Vayssiere, C. Cruaud, E. A. Cabanis, M. M. Ruchoux, J. Weissenbach, J. F. Bach, M. G. Bousser and E. Tournier-Lasserve (1996). "Notch3 mutations in CADASIL, a hereditary adult-onset condition causing stroke and dementia." **Nature 383**(6602): 707-710.

Kageyama, R., T. Ohtsuka and T. Kobayashi (2007). "The Hes gene family: repressors and oscillators that orchestrate embryogenesis." **Development 134**(7): 1243-1251.

Kai, H., T. Mori, K. Tokuda, N. Takayama, N. Tahara, K. Takemiya, H. Kudo, Y. Sugi, D. Fukui, H. Yasukawa, F. Kuwahara and T. Imaizumi (2006). "Pressure overload-induced transient oxidative stress mediates perivascular inflammation and cardiac fibrosis through angiotensin II." **Hypertens Res 29**(9): 711-718.

Kamath, B. M., R. C. Bauer, K. M. Loomes, G. Chao, J. Gerfen, A. Hutchinson, W. Hardikar, G. Hirschfield, P. Jara, I. D. Krantz, P. Lapunzina, L. Leonard, S. Ling, V. L. Ng, P. L. Hoang, D. A. Piccoli and N. B. Spinner (2012). "NOTCH2 mutations in Alagille syndrome." **J Med Genet 49**(2): 138-144.

Kanda, S., Y. Miyata and H. Kanetake (2004). "Fibroblast growth factor-2-mediated capillary morphogenesis of endothelial cells requires signals via Flt-1/vascular endothelial growth factor receptor-1: possible involvement of c-Akt." **J Biol Chem 279**(6): 4007-4016.

Kehat, I., J. Davis, M. Tiburcy, F. Accornero, M. K. Saba-El-Leil, M. Maillet, A. J. York, J. N. Lorenz, W. H. Zimmermann, S. Meloche and J. D. Molkentin (2011). "Extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 regulate the balance between eccentric and concentric cardiac growth." **Circ Res 108**(2): 176-183.

Kendall, R. L., G. Wang and K. A. Thomas (1996). "Identification of a natural soluble form of the vascular endothelial growth factor receptor, FLT-1, and its heterodimerization with KDR." **Biochem Biophys Res Commun 226**(2): 324-328.

Kenessey, A. and K. Ojamaa (2006). "Thyroid hormone stimulates protein synthesis in the cardiomyocyte by activating the Akt-mTOR and p70S6K pathways." **J Biol Chem 281**(30): 20666-20672.

Khan, S. G., N. Melikian, S. Mushemi-Blake, W. Dennes, F. Jouhra, M. Monaghan and A. M. Shah (2016). "Physiological Reduction in Left Ventricular Contractile Function in Healthy Postpartum Women: Potential Overlap with Peripartum Cardiomyopathy." **PLoS One 11**(2): e0147074.

Kitagawa, M., M. Hojo, I. Imayoshi, M. Goto, M. Ando, T. Ohtsuka, R. Kageyama and S. Miyamoto (2013). "Hes1 and Hes5 regulate vascular remodeling and arterial specification of endothelial cells in brain vascular development." **Mech Dev 130**(9-10): 458-466.

Kittle, C. F., H. Aoki and E. B. Brown, Jr. (1965). "The Role of Ph and Co2 in the Distribution of Blood Flow." **Surgery 57**: 139-154.

Kojda, G. and D. Harrison (1999). "Interactions between NO and reactive oxygen species: pathophysiological importance in atherosclerosis, hypertension, diabetes and heart failure." **Cardiovasc Res 43**(3): 562-571.

Konishi, J., K. S. Kawaguchi, H. Vo, N. Haruki, A. Gonzalez, D. P. Carbone and T. P. Dang (2007). "Gamma-secretase inhibitor prevents Notch3 activation and reduces proliferation in human lung cancers." **Cancer Res 67**(17): 8051-8057.

Kopan, R. and M. X. Ilagan (2009). "The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism." **Cell 137**(2): 216-233.

Koren, M. J., R. B. Devereux, P. N. Casale, D. D. Savage and J. H. Laragh (1991). "Relation of left ventricular mass and geometry to morbidity and mortality in uncomplicated essential hypertension." **Ann Intern Med 114**(5): 345-352.

Krebs, L. T., J. R. Shutter, K. Tanigaki, T. Honjo, K. L. Stark and T. Gridley (2004). "Haploinsufficient lethality and formation of arteriovenous malformations in Notch pathway mutants." **Genes Dev 18**(20): 2469-2473.

Krebs, L. T., Y. Xue, C. R. Norton, J. P. Sundberg, P. Beatus, U. Lendahl, A. Joutel and T. Gridley (2003). "Characterization of Notch3-deficient mice: normal embryonic development and absence of genetic interactions with a Notch1 mutation." **Genesis 37**(3): 139-143.

Kubota, T., C. F. McTiernan, C. S. Frye, S. E. Slawson, B. H. Lemster, A. P. Koretsky, A. J. Demetris and A. M. Feldman (1997). "Dilated cardiomyopathy in transgenic mice with cardiac-specific overexpression of tumor necrosis factor-alpha." **Circ Res 81**(4): 627-635.

Kurpinski, K., H. Lam, J. Chu, A. Wang, A. Kim, E. Tsay, S. Agrawal, D. V. Schaffer and S. Li (2010). "Transforming growth factor-beta and notch signaling mediate stem cell differentiation into smooth muscle cells." **Stem Cells 28**(4): 734-742.

Lamar, E., G. Deblandre, D. Wettstein, V. Gawantka, N. Pollet, C. Niehrs and C. Kintner (2001). "Nrarp is a novel intracellular component of the Notch signaling pathway." **Genes Dev 15**(15): 1885-1899.

Laughlin, M. H., D. K. Bowles and D. J. Duncker (2012). "The coronary circulation in exercise training." **Am J Physiol Heart Circ Physiol 302**(1): H10-23.

Lawson, N. D., N. Scheer, V. N. Pham, C. H. Kim, A. B. Chitnis, J. A. Campos-Ortega and B. M. Weinstein (2001). "Notch signaling is required for arterial-venous differentiation during embryonic vascular development." **Development 128**(19): 3675-3683.

Leask, A. and D. J. Abraham (2004). "TGF-beta signaling and the fibrotic response." **FASEB J 18**(7): 816-827.

Lee, J., E. H. Bae, S. K. Ma and S. W. Kim (2016). "Altered Nitric Oxide System in Cardiovascular and Renal Diseases." **Chonnam Med J 52**(2): 81-90.

Lee, R. M., R. E. Garfield, J. B. Forrest and E. E. Daniel (1983). "Morphometric study of structural changes in the mesenteric blood vessels of spontaneously hypertensive rats." **Blood Vessels 20**(2): 57-71.

Lesnik Oberstein, S. A., J. W. Jukema, S. G. Van Duinen, P. W. Macfarlane, H. C. van Houwelingen, M. H. Breuning, M. D. Ferrari and J. Haan (2003). "Myocardial infarction in cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (CADASIL)." **Medicine (Baltimore) 82**(4): 251-256.

Leung, D. W., G. Cachianes, W. J. Kuang, D. V. Goeddel and N. Ferrara (1989). "Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen." **Science 246**(4935): 1306-1309.

Levesque, M. J. and R. M. Nerem (1985). "The elongation and orientation of cultured endothelial cells in response to shear stress." **J Biomech Eng 107**(4): 341-347.

Levy, D., R. J. Garrison, D. D. Savage, W. B. Kannel and W. P. Castelli (1990). "Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study." **N Engl J Med 322**(22): 1561-1566.

Li, J., S. Umar, A. Iorga, J. Y. Youn, Y. Wang, V. Regitz-Zagrosek, H. Cai and M. Eghbali (2012). "Cardiac vulnerability to ischemia/reperfusion injury drastically increases in late pregnancy." **Basic Res Cardiol 107**(4): 271.

Li, X., X. Zhang, R. Leathers, A. Makino, C. Huang, P. Parsa, J. Macias, J. X. Yuan, S. W. Jamieson and P. A. Thistlethwaite (2009). "Notch3 signaling promotes the development of pulmonary arterial hypertension." **Nat Med 15**(11): 1289-1297.

Liang, Q., O. F. Bueno, B. J. Wilkins, C. Y. Kuan, Y. Xia and J. D. Molkentin (2003). "c-Jun N-terminal kinases (JNK) antagonize cardiac growth through cross-talk with calcineurin-NFAT signaling." **EMBO J 22**(19): 5079-5089.

Libonati, J. R., A. Sabri, C. Xiao, S. M. Macdonnell and B. F. Renna (2011). "Exercise training improves systolic function in hypertensive myocardium." **J Appl Physiol (1985) 111**(6): 1637-1643.

Lin, L., R. Mernaugh, F. Yi, D. Blum, D. P. Carbone and T. P. Dang (2010). "Targeting specific regions of the Notch3 ligand-binding domain induces apoptosis and inhibits tumor growth in lung cancer." **Cancer Res 70**(2): 632-638.

Liu, H., S. Kennard and B. Lilly (2009). "NOTCH3 expression is induced in mural cells through an autoregulatory loop that requires endothelial-expressed JAGGED1." **Circ Res 104**(4): 466-475.

Liu, H., W. Zhang, S. Kennard, R. B. Caldwell and B. Lilly (2010). "Notch3 is critical for proper angiogenesis and mural cell investment." **Circ Res 107**(7): 860-870.

Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." **Methods 25**(4): 402-408.

Logeat, F., C. Bessia, C. Brou, O. LeBail, S. Jarriault, N. G. Seidah and A. Israel (1998). "The Notch1 receptor is cleaved constitutively by a furin-like convertase." **Proc Natl Acad Sci U S A 95**(14): 8108-8112.

Loirand, G., P. Guerin and P. Pacaud (2006). "Rho kinases in cardiovascular physiology and pathophysiology." **Circ Res 98**(3): 322-334.

Lompre, A. M., B. Nadal-Ginard and V. Mahdavi (1984). "Expression of the cardiac ventricular alpha- and beta-myosin heavy chain genes is developmentally and hormonally regulated." **J Biol Chem 259**(10): 6437-6446.

Lu, L., D. F. Mei, A. G. Gu, S. Wang, B. Lentzner, D. E. Gutstein, D. Zwas, S. Homma, G. H. Yi and J. Wang (2002). "Exercise training normalizes altered calcium-handling proteins during development of heart failure." **J Appl Physiol (1985) 92**(4): 1524-1530.

Ma, F., Y. Li, L. Jia, Y. Han, J. Cheng, H. Li, Y. Qi and J. Du (2012). "Macrophage-stimulated cardiac fibroblast production of IL-6 is essential for TGF beta/Smad activation and cardiac fibrosis induced by angiotensin II." **PLoS One 7**(5): e35144.

Ma, X., Y. Fu, H. Xiao, Y. Song, R. Chen, J. Shen, X. An, Q. Shen, Z. Li and Y. Zhang (2015). "Cardiac Fibrosis Alleviated by Exercise Training Is AMPK-Dependent." **PLoS One 10**(6): e0129971.

MacKenna, D., S. R. Summerour and F. J. Villarreal (2000). "Role of mechanical factors in modulating cardiac fibroblast function and extracellular matrix synthesis." **Cardiovasc Res 46**(2): 257-263.

Maillet, M., J. H. van Berlo and J. D. Molkentin (2013). "Molecular basis of physiological heart growth: fundamental concepts and new players." **Nat Rev Mol Cell Biol 14**(1): 38-48.

Mandala, M. and G. Osol (2012). "Physiological remodelling of the maternal uterine circulation during pregnancy." **Basic Clin Pharmacol Toxicol 110**(1): 12-18.

Maron, B. J., A. Pelliccia, A. Spataro and M. Granata (1993). "Reduction in left ventricular wall thickness after deconditioning in highly trained Olympic athletes." **Br Heart J 69**(2): 125-128.

McCormack, C. E. and W. F. Strauss (1975). "Reversal by progesterone of phenobarbitone blockade of ovulation in the prepubertal rat primed with pregnant mare serum gonadotrophin." **J Endocrinol 65**(2): 177-182.

McCright, B., X. Gao, L. Shen, J. Lozier, Y. Lan, M. Maguire, D. Herzlinger, G. Weinmaster, R. Jiang and T. Gridley (2001). "Defects in development of the kidney, heart and eye vasculature in mice homozygous for a hypomorphic Notch2 mutation." **Development 128**(4): 491-502.

Medeiros, A., N. P. Rolim, R. S. Oliveira, K. T. Rosa, K. C. Mattos, D. E. Casarini, M. C. Irigoyen, E. M. Krieger, J. E. Krieger, C. E. Negrao and P. C. Brum (2008). "Exercise training delays cardiac dysfunction and prevents calcium handling abnormalities in sympathetic hyperactivity-induced heart failure mice." **J Appl Physiol (1985) 104**(1): 103-109.

Monet, M., V. Domenga, B. Lemaire, C. Souilhol, F. Langa, C. Babinet, T. Gridley, E. Tournier-Lasserve, M. Cohen-Tannoudji and A. Joutel (2007). "The archetypal R90C CADASIL-NOTCH3 mutation retains NOTCH3 function in vivo." **Hum Mol Genet 16**(8): 982-992.

Morrow, D., S. Guha, C. Sweeney, Y. Birney, T. Walshe, C. O'Brien, D. Walls, E. M. Redmond and P. A. Cahill (2008). "Notch and vascular smooth muscle cell phenotype." **Circ Res 103**(12): 1370-1382.

Movat, H. Z. and N. V. Fernando (1963). "The Fine Structure of the Terminal Vascular Bed. I. Small Arteries with an Internal Elastic Lamina." **Exp Mol Pathol 14**: 549-563.

Mulvany, M. J. and C. Aalkjaer (1990). "Structure and function of small arteries." **Physiol Rev 70**(4): 921-961.

Mulvany, M. J., U. Baandrup and H. J. Gundersen (1985). "Evidence for hyperplasia in mesenteric resistance vessels of spontaneously hypertensive rats using a three-dimensional disector." **Circ Res 57**(5): 794-800.

Mulvany, M. J., G. L. Baumbach, C. Aalkjaer, A. M. Heagerty, N. Korsgaard, E. L. Schiffrin and D. D. Heistad (1996). "Vascular remodeling." **Hypertension 28**(3): 505-506.

Munzel, T., T. Gori, J. F. Keaney, Jr., C. Maack and A. Daiber (2015). "Pathophysiological role of oxidative stress in systolic and diastolic heart failure and its therapeutic implications." **Eur Heart J 36**(38): 2555-2564.

Munzel, T., C. Sinning, F. Post, A. Warnholtz and E. Schulz (2008). "Pathophysiology, diagnosis and prognostic implications of endothelial dysfunction." **Ann Med 40**(3): 180-196.

Nagai, T., T. Anzai, H. Kaneko, Y. Mano, A. Anzai, Y. Maekawa, T. Takahashi, T. Meguro, T. Yoshikawa and K. Fukuda (2011). "C-reactive protein overexpression exacerbates

pressure overload-induced cardiac remodeling through enhanced inflammatory response." **Hypertension 57**(2): 208-215.
Nava, M., Y. Quiroz, N. Vaziri and B. Rodriguez-Iturbe (2003). "Melatonin reduces renal interstitial inflammation and improves hypertension in spontaneously hypertensive rats." **Am J Physiol Renal Physiol 284**(3): F447-454.
Nemir, M., M. Metrich, I. Plaisance, M. Lepore, S. Cruchet, C. Berthonneche, A. Sarre, F. Radtke and T. Pedrazzini (2014). "The Notch pathway controls fibrotic and regenerative repair in the adult heart." **Eur Heart J 35**(32): 2174-2185.
Neri Serneri, G. G., M. Boddi, P. A. Modesti, I. Cecioni, M. Coppo, L. Padeletti, A. Michelucci, A. Colella and G. Galanti (2001). "Increased cardiac sympathetic activity and insulin-like growth factor-I formation are associated with physiological hypertrophy in athletes." **Circ Res 89**(11): 977-982.
Nishida, K., O. Yamaguchi, S. Hirotani, S. Hikoso, Y. Higuchi, T. Watanabe, T. Takeda, S. Osuka, T. Morita, G. Kondoh, Y. Uno, K. Kashiwase, M. Taniike, A. Nakai, Y. Matsumura, J. Miyazaki, T. Sudo, K. Hongo, Y. Kusakari, S. Kurihara, K. R. Chien, J. Takeda, M. Hori and K. Otsu (2004). "p38alpha mitogen-activated protein kinase plays a critical role in cardiomyocyte survival but not in cardiac hypertrophic growth in response to pressure overload." **Mol Cell Biol 24**(24): 10611-10620.
Noguera-Troise, I., C. Daly, N. J. Papadopoulos, S. Coetzee, P. Boland, N. W. Gale, H. C. Lin, G. D. Yancopoulos and G. Thurston (2006). "Blockade of Dll4 inhibits tumour growth by promoting non-productive angiogenesis." **Nature 444**(7122): 1032-1037.
Noseda, M., Y. Fu, K. Niessen, F. Wong, L. Chang, G. McLean and A. Karsan (2006). "Smooth Muscle alpha-actin is a direct target of Notch/CSL." **Circ Res 98**(12): 1468-1470.
Noseda, M., G. McLean, K. Niessen, L. Chang, I. Pollet, R. Montpetit, R. Shahidi, K. Dorovini-Zis, L. Li, B. Beckstead, R. E. Durand, P. A. Hoodless and A. Karsan (2004). "Notch activation results in phenotypic and functional changes consistent with endothelial-to-mesenchymal transformation." **Circ Res 94**(7): 910-917.
Oie, E., W. J. Sandberg, M. S. Ahmed, A. Yndestad, O. D. Laerum, H. Attramadal, P. Aukrust and H. G. Eiken (2010). "Activation of Notch signaling in cardiomyocytes during post-infarction remodeling." **Scand Cardiovasc J 44**(6): 359-366.
Oka, T., H. Akazawa, A. T. Naito and I. Komuro (2014). "Angiogenesis and cardiac hypertrophy: maintenance of cardiac function and causative roles in heart failure." **Circ Res 114**(3): 565-571.
Oliveira, R. S., J. C. Ferreira, E. R. Gomes, N. A. Paixao, N. P. Rolim, A. Medeiros, S. Guatimosim and P. C. Brum (2009). "Cardiac anti-remodelling effect of aerobic training is associated with a reduction in the calcineurin/NFAT signalling pathway in heart failure mice." **J Physiol 587**(Pt 15): 3899-3910.
Opherk, C., N. Peters, J. Herzog, R. Luedtke and M. Dichgans (2004). "Long-term prognosis and causes of death in CADASIL: a retrospective study in 411 patients." **Brain 127**(Pt 11): 2533-2539.
Opie, L. H., P. J. Commerford, B. J. Gersh and M. A. Pfeffer (2006). "Controversies in ventricular remodelling." **Lancet 367**(9507): 356-367.
Ozawa, T., S. Kazama, T. Akiyoshi, K. Murono, S. Yoneyama, T. Tanaka, J. Tanaka, T. Kiyomatsu, K. Kawai, H. Nozawa, T. Kanazawa, H. Yamaguchi, S. Ishihara, E. Sunami, J. Kitayama, T. Morikawa, M. Fukayama and T. Watanabe (2014). "Nuclear Notch3 expression is associated with tumor recurrence in patients with stage II and III colorectal cancer." **Ann Surg Oncol 21**(8): 2650-2658.
Pancewicz, J. and C. Nicot (2011). "Current views on the role of Notch signaling and the pathogenesis of human leukemia." **BMC Cancer 11**: 502.

Park, J. B. and E. L. Schiffrin (2001). "Small artery remodeling is the most prevalent (earliest?) form of target organ damage in mild essential hypertension." **J Hypertens 19**(5): 921-930.

Park, J. T., M. Li, K. Nakayama, T. L. Mao, B. Davidson, Z. Zhang, R. J. Kurman, C. G. Eberhart, M. Shih Ie and T. L. Wang (2006). "Notch3 gene amplification in ovarian cancer." **Cancer Res 66**(12): 6312-6318.

Parlakian, A., C. Charvet, B. Escoubet, M. Mericskay, J. D. Molkentin, G. Gary-Bobo, L. J. De Windt, M. A. Ludosky, D. Paulin, D. Daegelen, D. Tuil and Z. Li (2005). "Temporally controlled onset of dilated cardiomyopathy through disruption of the SRF gene in adult heart." **Circulation 112**(19): 2930-2939.

Passier, R., H. Zeng, N. Frey, F. J. Naya, R. L. Nicol, T. A. McKinsey, P. Overbeek, J. A. Richardson, S. R. Grant and E. N. Olson (2000). "CaM kinase signaling induces cardiac hypertrophy and activates the MEF2 transcription factor in vivo." **J Clin Invest 105**(10): 1395-1406.

Patten, I. S., S. Rana, S. Shahul, G. C. Rowe, C. Jang, L. Liu, M. R. Hacker, J. S. Rhee, J. Mitchell, F. Mahmood, P. Hess, C. Farrell, N. Koulisis, E. V. Khankin, S. D. Burke, I. Tudorache, J. Bauersachs, F. del Monte, D. Hilfiker-Kleiner, S. A. Karumanchi and Z. Arany (2012). "Cardiac angiogenic imbalance leads to peripartum cardiomyopathy." **Nature 485**(7398): 333-338.

Pelliccia, A., A. Spataro, M. Granata, A. Biffi, G. Caselli and A. Alabiso (1990). "Coronary arteries in physiological hypertrophy: echocardiographic evidence of increased proximal size in elite athletes." **Int J Sports Med 11**(2): 120-126.

Piccirillo, G., D. Magri, M. Mitra, A. Rufa, E. Zicari, M. L. Stromillo, N. De Stefano and M. T. Dotti (2008). "Increased QT variability in cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy." **Eur J Neurol 15**(11): 1216-1221.

Plouet, J., J. Schilling and D. Gospodarowicz (1989). "Isolation and characterization of a newly identified endothelial cell mitogen produced by AtT-20 cells." **EMBO J 8**(12): 3801-3806.

Pries, A. R., T. W. Secomb and P. Gaehtgens (1995). "Design principles of vascular beds." **Circ Res 77**(5): 1017-1023.

Proweller, A., W. S. Pear and M. S. Parmacek (2005). "Notch signaling represses myocardin-induced smooth muscle cell differentiation." **J Biol Chem 280**(10): 8994-9004.

Ragot, H., A. Monfort, M. Baudet, F. Azibani, L. Fazal, R. Merval, E. Polidano, A. Cohen-Solal, C. Delcayre, N. Vodovar, C. Chatziantoniou and J. L. Samuel (2016). "Loss of Notch3 Signaling in Vascular Smooth Muscle Cells Promotes Severe Heart Failure Upon Hypertension." **Hypertension**.

Raij, L. (2006). "Nitric oxide in the pathogenesis of cardiac disease." **J Clin Hypertens (Greenwich) 8**(12 Suppl 4): 30-39.

Rana, N. A. and R. S. Haltiwanger (2011). "Fringe benefits: functional and structural impacts of O-glycosylation on the extracellular domain of Notch receptors." **Curr Opin Struct Biol 21**(5): 583-589.

Rebay, I., R. J. Fleming, R. G. Fehon, L. Cherbas, P. Cherbas and S. Artavanis-Tsakonas (1991). "Specific EGF repeats of Notch mediate interactions with Delta and Serrate: implications for Notch as a multifunctional receptor." **Cell 67**(4): 687-699.

Risau, W. (1997). "Mechanisms of angiogenesis." **Nature 386**(6626): 671-674.

Rizzo, P., L. Miele and R. Ferrari (2013). "The Notch pathway: a crossroad between the life and death of the endothelium." **Eur Heart J 34**(32): 2504-2509.

Rodriguez-Iturbe, B., Y. Quiroz, A. Ferrebuz, G. Parra and N. D. Vaziri (2004). "Evolution of renal interstitial inflammation and NF-kappaB activation in spontaneously hypertensive rats." **Am J Nephrol 24**(6): 587-594.

Rodriguez-Iturbe, B., C. D. Zhan, Y. Quiroz, R. K. Sindhu and N. D. Vaziri (2003). "Antioxidant-rich diet relieves hypertension and reduces renal immune infiltration in spontaneously hypertensive rats." **Hypertension 41**(2): 341-346.

Rosenkranz, S., M. Flesch, K. Amann, C. Haeuseler, H. Kilter, U. Seeland, K. D. Schluter and M. Bohm (2002). "Alterations of beta-adrenergic signaling and cardiac hypertrophy in transgenic mice overexpressing TGF-beta(1)." **Am J Physiol Heart Circ Physiol 283**(3): H1253-1262.

Rossoni, L. V., R. A. Oliveira, R. R. Caffaro, M. Miana, D. Sanz-Rosa, M. K. Koike, S. L. Do Amaral, L. C. Michelini, V. Lahera and V. Cachofeiro (2011). "Cardiac benefits of exercise training in aging spontaneously hypertensive rats." **J Hypertens 29**(12): 2349-2358.

Rubin, C. B., V. Hahn, T. Kobayashi and A. Litwack (2015). "A Report of Accelerated Coronary Artery Disease Associated with Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy." **Case Rep Cardiol 2015**: 167513.

Ruchoux, M. M., H. Chabriat, M. G. Bousser, M. Baudrimont and E. Tournier-Lasserve (1994). "Presence of ultrastructural arterial lesions in muscle and skin vessels of patients with CADASIL." **Stroke 25**(11): 2291-2292.

Ruchoux, M. M., D. Guerouaou, B. Vandenhaute, J. P. Pruvo, P. Vermersch and D. Leys (1995). "Systemic vascular smooth muscle cell impairment in cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy." **Acta Neuropathol 89**(6): 500-512.

Ruchoux, M. M. and C. A. Maurage (1997). "CADASIL: Cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy." **J Neuropathol Exp Neurol 56**(9): 947-964.

Rufa, A., F. Guideri, M. Acampa, G. Cevenini, S. Bianchi, N. De Stefano, M. L. Stromillo, A. Federico and M. T. Dotti (2007). "Cardiac autonomic nervous system and risk of arrhythmias in cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (CADASIL)." **Stroke 38**(2): 276-280.

Sato, Y., R. Tsuboi, R. Lyons, H. Moses and D. B. Rifkin (1990). "Characterization of the activation of latent TGF-beta by co-cultures of endothelial cells and pericytes or smooth muscle cells: a self-regulating system." **J Cell Biol 111**(2): 757-763.

Savu, O., R. Jurcut, S. Giusca, T. van Mieghem, I. Gussi, B. A. Popescu, C. Ginghina, F. Rademakers, J. Deprest and J. U. Voigt (2012). "Morphological and functional adaptation of the maternal heart during pregnancy." **Circ Cardiovasc Imaging 5**(3): 289-297.

Schannwell, C. M., T. Zimmermann, M. Schneppenheim, G. Plehn, R. Marx and B. E. Strauer (2002). "Left ventricular hypertrophy and diastolic dysfunction in healthy pregnant women." **Cardiology 97**(2): 73-78.

Schiattarella, G. G. and J. A. Hill (2015). "Inhibition of hypertrophy is a good therapeutic strategy in ventricular pressure overload." **Circulation 131**(16): 1435-1447.

Schiffrin, E. L. (2001). "Role of endothelin-1 in hypertension and vascular disease." **Am J Hypertens 14**(6 Pt 2): 83S-89S.

Schiffrin, E. L. (2004). "Remodeling of resistance arteries in essential hypertension and effects of antihypertensive treatment." **Am J Hypertens 17**(12 Pt 1): 1192-1200.

Schiffrin, E. L. (2012). "Vascular remodeling in hypertension: mechanisms and treatment." **Hypertension 59**(2): 367-374.

Schwartz, S. M. and E. P. Benditt (1972). "Studies on aortic intima. I. Structure and permeability of rat thoracic aortic intima." **Am J Pathol 66**(2): 241-264.

Sciacca, S., M. Pilato, G. Mazzoccoli, V. Pazienza and M. Vinciguerra (2013). "Anti-correlation between longevity gene SirT1 and Notch signaling in ascending aorta biopsies from patients with bicuspid aortic valve disease." **Heart Vessels 28**(2): 268-275.

Selthofer-Relatic, K., I. Bosnjak and A. Kibel (2016). "Obesity Related Coronary Microvascular Dysfunction: From Basic to Clinical Practice." **Cardiol Res Pract 2016**: 8173816.

Shalaby, F., J. Rossant, T. P. Yamaguchi, M. Gertsenstein, X. F. Wu, M. L. Breitman and A. C. Schuh (1995). "Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice." **Nature 376**(6535): 62-66.

Sharma, U. C., S. Pokharel, T. J. van Brakel, J. H. van Berlo, J. P. Cleutjens, B. Schroen, S. Andre, H. J. Crijns, H. J. Gabius, J. Maessen and Y. M. Pinto (2004). "Galectin-3 marks activated macrophages in failure-prone hypertrophied hearts and contributes to cardiac dysfunction." **Circulation 110**(19): 3121-3128.

Shibuya, M. and L. Claesson-Welsh (2006). "Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis." **Exp Cell Res 312**(5): 549-560.

Shibuya, M., N. Ito and L. Claesson-Welsh (1999). "Structure and function of vascular endothelial growth factor receptor-1 and -2." **Curr Top Microbiol Immunol 237**: 59-83.

Shimizu, I. and T. Minamino (2016). "Physiological and pathological cardiac hypertrophy." **J Mol Cell Cardiol 97**: 245-262.

Shimizu, K., S. Chiba, K. Kumano, N. Hosoya, T. Takahashi, Y. Kanda, Y. Hamada, Y. Yazaki and H. Hirai (1999). "Mouse jagged1 physically interacts with notch2 and other notch receptors. Assessment by quantitative methods." **J Biol Chem 274**(46): 32961-32969.

Shimokawa, H., N. A. Flavahan, R. R. Lorenz and P. M. Vanhoutte (1988). "Prostacyclin releases endothelium-derived relaxing factor and potentiates its action in coronary arteries of the pig." **Br J Pharmacol 95**(4): 1197-1203.

Shiojima, I., K. Sato, Y. Izumiya, S. Schiekofer, M. Ito, R. Liao, W. S. Colucci and K. Walsh (2005). "Disruption of coordinated cardiac hypertrophy and angiogenesis contributes to the transition to heart failure." **J Clin Invest 115**(8): 2108-2118.

Shyy, J. Y. and S. Chien (2002). "Role of integrins in endothelial mechanosensing of shear stress." **Circ Res 91**(9): 769-775.

Soriano, P. (1999). "Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain." **Nat Genet 21**(1): 70-71.

Souilhol, C., S. Cormier, K. Tanigaki, C. Babinet and M. Cohen-Tannoudji (2006). "RBP-Jkappa-dependent notch signaling is dispensable for mouse early embryonic development." **Mol Cell Biol 26**(13): 4769-4774.

Spach, M. S. and J. P. Boineau (1997). "Microfibrosis produces electrical load variations due to loss of side-to-side cell connections: a major mechanism of structural heart disease arrhythmias." **Pacing Clin Electrophysiol 20**(2 Pt 2): 397-413.

Struhl, G. and I. Greenwald (2001). "Presenilin-mediated transmembrane cleavage is required for Notch signal transduction in Drosophila." **Proc Natl Acad Sci U S A 98**(1): 229-234.

Sun, X., J. R. Kanwar, E. Leung, K. Lehnert, D. Wang and G. W. Krissansen (2001). "Angiostatin enhances B7.1-mediated cancer immunotherapy independently of effects on vascular endothelial growth factor expression." **Cancer Gene Ther 8**(10): 719-727.

Sweeney, C., D. Morrow, Y. A. Birney, S. Coyle, C. Hennessy, A. Scheller, P. M. Cummins, D. Walls, E. M. Redmond and P. A. Cahill (2004). "Notch 1 and 3 receptor signaling

modulates vascular smooth muscle cell growth, apoptosis, and migration via a CBF-1/RBP-Jk dependent pathway." **FASEB J 18**(12): 1421-1423.
Swiatek, P. J., C. E. Lindsell, F. F. del Amo, G. Weinmaster and T. Gridley (1994). "Notch1 is essential for postimplantation development in mice." **Genes Dev 8**(6): 707-719.
Swynghedauw, B. (1990). "The biological limits of cardiac adaptation to chronic overload." **Eur Heart J 11 Suppl G**: 87-94.
Tabet, J. Y., P. Meurin, A. B. Driss, H. Weber, N. Renaud, A. Grosdemouge, F. Beauvais and A. Cohen-Solal (2009). "Benefits of exercise training in chronic heart failure." **Arch Cardiovasc Dis 102**(10): 721-730.
Taddei, S. and P. M. Vanhoutte (1993). "Endothelium-dependent contractions to endothelin in the rat aorta are mediated by thromboxane A2." **J Cardiovasc Pharmacol 22 Suppl 8**: S328-331.
Takahashi, Y. and M. Mai (2005). "Antibody against vascular endothelial growth factor (VEGF) inhibits angiogenic switch and liver metastasis in orthotopic xenograft model with site-dependent expression of VEGF." **J Exp Clin Cancer Res 24**(2): 237-243.
Takaishi, K., T. Sasaki, H. Kotani, H. Nishioka and Y. Takai (1997). "Regulation of cell-cell adhesion by rac and rho small G proteins in MDCK cells." **J Cell Biol 139**(4): 1047-1059.
Tang, Y., S. Urs and L. Liaw (2008). "Hairy-related transcription factors inhibit Notch-induced smooth muscle alpha-actin expression by interfering with Notch intracellular domain/CBF-1 complex interaction with the CBF-1-binding site." **Circ Res 102**(6): 661-668.
Tang, Y., X. Yang, R. E. Friesel, C. P. Vary and L. Liaw (2011). "Mechanisms of TGF-beta-induced differentiation in human vascular smooth muscle cells." **J Vasc Res 48**(6): 485-494.
Thurston, G., I. Noguera-Troise and G. D. Yancopoulos (2007). "The Delta paradox: DLL4 blockade leads to more tumour vessels but less tumour growth." **Nat Rev Cancer 7**(5): 327-331.
Toescu, V., S. L. Nuttall, U. Martin, M. J. Kendall and F. Dunne (2002). "Oxidative stress and normal pregnancy." **Clin Endocrinol (Oxf) 57**(5): 609-613.
Tsagalou, E. P., M. Anastasiou-Nana, E. Agapitos, A. Gika, S. G. Drakos, J. V. Terrovitis, A. Ntalianis and J. N. Nanas (2008). "Depressed coronary flow reserve is associated with decreased myocardial capillary density in patients with heart failure due to idiopathic dilated cardiomyopathy." **J Am Coll Cardiol 52**(17): 1391-1398.
Tsaousi, A., C. Mill and S. J. George (2011). "The Wnt pathways in vascular disease: lessons from vascular development." **Curr Opin Lipidol 22**(5): 350-357.
Umar, S., R. Nadadur, A. Iorga, M. Amjedi, H. Matori and M. Eghbali (2012). "Cardiac structural and hemodynamic changes associated with physiological heart hypertrophy of pregnancy are reversed postpartum." **J Appl Physiol (1985) 113**(8): 1253-1259.
van Berlo, J. H., M. Maillet and J. D. Molkentin (2013). "Signaling effectors underlying pathologic growth and remodeling of the heart." **J Clin Invest 123**(1): 37-45.
van Deel, E. D., M. de Boer, D. W. Kuster, N. M. Boontje, P. Holemans, K. R. Sipido, J. van der Velden and D. J. Duncker (2011). "Exercise training does not improve cardiac function in compensated or decompensated left ventricular hypertrophy induced by aortic stenosis." **J Mol Cell Cardiol 50**(6): 1017-1025.
Vaziri, N. D. (2008). "Causal link between oxidative stress, inflammation, and hypertension." **Iran J Kidney Dis 2**(1): 1-10.
Ventura-Clapier, R. (2009). "Exercise training, energy metabolism, and heart failure." **Appl Physiol Nutr Metab 34**(3): 336-339.

Ventura-Clapier, R., B. Mettauer and X. Bigard (2007). "Beneficial effects of endurance training on cardiac and skeletal muscle energy metabolism in heart failure." **Cardiovasc Res 73**(1): 10-18.

Vessieres, E., M. L. Freidja, L. Loufrani, C. Fassot and D. Henrion (2012). "Flow (shear stress)-mediated remodeling of resistance arteries in diabetes." **Vascul Pharmacol 57**(5-6): 173-178.

Villa, N., L. Walker, C. E. Lindsell, J. Gasson, M. L. Iruela-Arispe and G. Weinmaster (2001). "Vascular expression of Notch pathway receptors and ligands is restricted to arterial vessels." **Mech Dev 108**(1-2): 161-164.

Virgo, B. B. and G. D. Bellward (1974). "Serum progesterone levels in the pregnant and postpartum laboratory mouse." **Endocrinology 95**(5): 1486-1490.

Walsh, K. and I. Shiojima (2007). "Cardiac growth and angiogenesis coordinated by intertissue interactions." **J Clin Invest 117**(11): 3176-3179.

Wang, M., P. R. Crisostomo, T. Markel, Y. Wang, K. D. Lillemoe and D. R. Meldrum (2008). "Estrogen receptor beta mediates acute myocardial protection following ischemia." **Surgery 144**(2): 233-238.

Weber, K. T. (2000). "Fibrosis and hypertensive heart disease." **Curr Opin Cardiol 15**(4): 264-272.

Weeks, K. L. and J. R. McMullen (2011). "The athlete's heart vs. the failing heart: can signaling explain the two distinct outcomes?" **Physiology (Bethesda) 26**(2): 97-105.

Wei, L. H., M. L. Kuo, C. A. Chen, C. H. Chou, K. B. Lai, C. N. Lee and C. Y. Hsieh (2003). "Interleukin-6 promotes cervical tumor growth by VEGF-dependent angiogenesis via a STAT3 pathway." **Oncogene 22**(10): 1517-1527.

Wilkins, B. J. and J. D. Molkentin (2004). "Calcium-calcineurin signaling in the regulation of cardiac hypertrophy." **Biochem Biophys Res Commun 322**(4): 1178-1191.

Wirth, A., Z. Benyo, M. Lukasova, B. Leutgeb, N. Wettschureck, S. Gorbey, P. Orsy, B. Horvath, C. Maser-Gluth, E. Greiner, B. Lemmer, G. Schutz, J. S. Gutkind and S. Offermanns (2008). "G12-G13-LARG-mediated signaling in vascular smooth muscle is required for salt-induced hypertension." **Nat Med 14**(1): 64-68.

Wolinsky, H. and S. Glagov (1967). "A lamellar unit of aortic medial structure and function in mammals." **Circ Res 20**(1): 99-111.

Yamaguchi, N., T. Oyama, E. Ito, H. Satoh, S. Azuma, M. Hayashi, K. Shimizu, R. Honma, Y. Yanagisawa, A. Nishikawa, M. Kawamura, J. Imai, S. Ohwada, K. Tatsuta, J. Inoue, K. Semba and S. Watanabe (2008). "NOTCH3 signaling pathway plays crucial roles in the proliferation of ErbB2-negative human breast cancer cells." **Cancer Res 68**(6): 1881-1888.

Yanagisawa, M., H. Kurihara, S. Kimura, Y. Tomobe, M. Kobayashi, Y. Mitsui, Y. Yazaki, K. Goto and T. Masaki (1988). "A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells." **Nature 332**(6163): 411-415.

Yavropoulou, M. P. and J. G. Yovos (2014). "The role of Notch signaling in bone development and disease." **Hormones (Athens) 13**(1): 24-37.

Zhai, P., T. E. Eurell, R. Cotthaus, E. H. Jeffery, J. M. Bahr and D. R. Gross (2000). "Effect of estrogen on global myocardial ischemia-reperfusion injury in female rats." **Am J Physiol Heart Circ Physiol 279**(6): H2766-2775.

Zhang, C. L., T. A. McKinsey, S. Chang, C. L. Antos, J. A. Hill and E. N. Olson (2002). "Class II histone deacetylases act as signal-responsive repressors of cardiac hypertrophy." **Cell 110**(4): 479-488.

Zhang, M., X. Pan, Q. Zou, Y. Xia, J. Chen, Q. Hao, H. Wang and D. Sun (2015). "Notch3 Ameliorates Cardiac Fibrosis After Myocardial Infarction by Inhibiting the TGF-beta1/Smad3 Pathway." **Cardiovasc Toxicol**.

Zhang, Y. L., S. X. Zhou, J. Lei, G. Y. Yuan and J. F. Wang (2008). "Blockades of angiotensin and aldosterone reduce osteopontin expression and interstitial fibrosis infiltration in rats with myocardial infarction." **Chin Med J (Engl) 121**(21): 2192-2196.

Zhou, X. L. and J. C. Liu (2014). "Role of Notch signaling in the mammalian heart." **Braz J Med Biol Res 47**(1): 1-10.

Zhou, Y., K. Bourcy and Y. J. Kang (2009). "Copper-induced regression of cardiomyocyte hypertrophy is associated with enhanced vascular endothelial growth factor receptor-1 signalling pathway." **Cardiovasc Res 84**(1): 54-63.