



Université de Montréal

# **Étude de la régulation de l'activité du ligand Delta dans le cadre de la signalisation Notch**

par

Gloria Assaker

Programmes de biologie moléculaire, Option biologie des systèmes  
Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté de médecine  
en vue de l'obtention du grade de doctorat (PhD)  
en biologie moléculaire  
option biologie des systèmes

Mai, 2015

© Gloria Assaker, 2015

## Résumé

La voie de signalisation Notch est conservée au cours de l'évolution. Elle joue un rôle clé dans le développement, et elle est impliquée dans de nombreuses décisions de destin cellulaire, dans le maintien des cellules souches, et dans le contrôle de la prolifération et de la différenciation cellulaires. Une dérégulation de la signalisation Notch est impliquée dans diverses maladies et cancers, y compris les tumeurs solides, comme les cancers du sein et du col de l'utérus, et les leucémies, comme la Leucémie Aiguë Lymphoblastique des cellules T (LAL-T). Notch est un récepteur transmembranaire activé par des ligands transmembranaires de la famille DSL (Delta/Serrate/Lag-2). Bien que plusieurs mutations oncogéniques ont été identifiées au niveau du récepteur Notch, de nombreux cancers modulés par Notch demeurent ligand-dépendants. Étonnamment, les mécanismes moléculaires régulant l'activation du ligand sont encore relativement peu caractérisés par rapport à ceux qui régissent le récepteur Notch lui-même. Utilisant un essai de co-culture avec un rapporteur luciférase de Notch, nous avons effectué le premier crible d'ARNi pan-génomique visant spécifiquement à identifier des régulateurs des ligands de Notch dans la cellule émettrice du signal. Nous avons ainsi pu découvrir de nouvelles classes de régulateurs communs pour les ligands Delta-like1 et 4. Ces régulateurs comprennent des inhibiteurs de protéases, des facteurs de transcription, et des gènes divers à fonction inconnue, tels que *Tmem128* « *Transmembrane protein 128* », ou à fonction préalablement caractérisée tels que la co-chaperonne moléculaire *Cdc37* « *Cell division cycle 37 homolog* ». Par la suite, nous avons développé des cribles secondaires fonctionnels où nous avons démontré l'importance de ces régulateurs pour des événements Notch-dépendants, comme la différenciation des cellules T normales, et la survie des cellules souches pré-leucémiques isolées à partir d'un modèle murin de LAL-T. En outre, nous avons prouvé que les régulateurs les plus forts du crible de survie sont également nécessaires pour l'activité d'auto-renouvellement des cellules souches pré-leucémiques. Finalement, nous avons entamé une caractérisation moléculaire préliminaire de deux régulateurs nouvellement identifiés; *Tmem128* et *Cdc37* afin d'étudier leur mécanisme d'action sur les ligands. En conclusion, cette étude nous a permis d'identifier de nouveaux régulateurs de la voie Notch qui pourraient servir de cibles thérapeutiques potentielles dans les cancers; tel qu'illustré par le

modèle LAL-T. La compréhension des détails moléculaires sous-jacents aux fonctions de ces régulateurs sera essentielle afin de développer des inhibiteurs pharmacologiques pour bloquer leur action et entraver la signalisation Notch dans le cancer.

**Mots-clés :** Notch, Delta-like, crible, inhibiteurs de protéases, Tmem128, Cdc37, différenciation des cellules T, LAL-T.

## Abstract

The Notch signalling pathway is evolutionarily conserved. It plays a key role in development and it is involved in multiple cell fate decisions, in the maintenance of stem cells, and in the regulation of cell proliferation and differentiation. Misregulation of Notch signalling is implicated in various diseases and cancers including solid tumours, such as breast and cervical cancers, and leukemias, such as T-cell Acute Lymphoblastic Leukemia (T-ALL). Notch is a transmembrane receptor activated by transmembrane ligands of the DSL family (Delta/Serrate/Lag-2). Whereas oncogenic mutations have been identified in the Notch receptor, many Notch-mediated cancers remain ligand-dependent. Strikingly, the molecular mechanisms that regulate ligand activation are still poorly characterized as compared to those regulating the Notch receptor itself. Using a co-culture assay with a luciferase Notch reporter, we performed the first genome-wide RNAi screen aiming specifically at identifying regulators of Notch ligands in the signal-sending cell. We thereby unraveled new classes of common regulators for both Delta-like1 and 4 ligands. These regulators include protease inhibitors, transcription factors and various genes of unknown function such as *Tmem128* (*Transmembrane protein 128*), or of previously characterized function such as the molecular co-chaperone *Cdc37* (*Cell division cycle 37 homolog*). We next developed functional secondary screens where we demonstrated that our hits are important for Notch-mediated events, such as normal T-cell differentiation, and survival of pre-leukemic stem cells (pre-LSCs) isolated from a mouse model of T-ALL. Moreover, we showed that top hits from the pre-LSC survival screen are also required for the self-renewal activity of pre-LSCs. Finally, we performed a preliminary molecular characterization of two newly identified regulators; *Tmem128* and *Cdc37* in order to investigate their mechanism of action on Delta-like ligands. Altogether, this study led to the identification of novel Notch pathway regulators that could serve as potential therapeutic targets in Notch cancers, as exemplified by the T-ALL model. Elucidating the finer details that underlie the molecular functions of these regulators will be critical to develop pharmacological inhibitors to counteract their action and impede Notch signalling in cancer.

**Keywords** : Notch, Delta-like, screen, protease inhibitors, Tmem128, Cdc37, T-cell differentiation, T-ALL.

# Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	iii
Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	x
Liste des figures.....	xi
Liste des sigles et abréviations.....	xiii
Remerciements.....	xxi
Chapitre 1.....	1
1. Introduction.....	2
1.1. Voie de signalisation Notch.....	2
1.1.1. Bref historique.....	3
1.1.2. Mécanismes moléculaires de régulation.....	4
1.1.2.1. Interactions ligand-récepteur.....	4
1.1.2.2. Clivages protéolytiques du récepteur Notch.....	7
1.1.2.3. Endocytose et trafic du récepteur Notch.....	9
1.1.2.4. Régulation du domaine intracellulaire de Notch.....	11
1.1.3. Rôles au cours du développement.....	12
1.1.3.1. Diversité fonctionnelle durant le développement.....	12
1.1.3.2. Rôle dans les cellules souches.....	13
1.1.3.3. Événements physiologiques Notch-dépendants.....	14
1.1.3.4. Importance de la voie Notch dans le développement des cellules T.....	17
1.1.4. Rôles en pathologies.....	22
1.1.4.1. Rôles dans diverses maladies développementales.....	22
1.1.4.2. Rôles dans le cancer.....	23
1.1.4.3. Importance de la voie Notch dans le développement de la leucémie aiguë lymphoblastique des cellules T (LAL-T).....	28
1.1.4.4. Avancées thérapeutiques dans le ciblage de la voie Notch en cancer.....	31
1.2. Ligands de Notch.....	33

1.2.1. Les ligands canoniques à domaine DSL .....	34
1.2.1.1. Les ligands de la famille Delta-like .....	36
1.2.1.2. Les ligands de la famille Jagged .....	38
1.2.2. Les ligands non-canoniques ou atypiques.....	38
1.2.2.1. Les ligands non-canoniques attachés à la membrane .....	39
1.2.2.2. Les ligands non-canoniques ancrés par GPI .....	40
1.2.2.3. Les ligands non-canoniques sécrétés .....	40
1.2.3. Mécanismes de régulation des ligands canoniques.....	43
1.2.3.1. Régulation par ubiquitination .....	43
1.2.3.2. Régulation par endocytose et/ou recyclage.....	45
1.2.3.3. Régulation par protéolyse .....	48
1.2.3.4. Régulation par phosphorylation.....	50
1.2.3.5. Régulation par glycosylation .....	51
1.2.3.6. Régulation par liaison aux glycosphingolipides .....	51
1.2.3.7. Régulation par liaison à des protéines à domaines PDZ.....	52
1.2.3.8. Régulation de l'expression des ligands .....	53
1.3. Problématique de recherche et objectifs du projet de thèse.....	54
Chapitre 2.....	57
2. Matériel et méthodes.....	58
2.1. Plasmides et constructions d'ADN.....	58
2.2. Culture cellulaire.....	58
2.2.1. Lignées cellulaires .....	58
2.2.2. Cellules primaires .....	59
2.3. Crible primaire basé sur l'essai luciférase avec les cellules OP9-DL1 .....	60
2.4. Crible secondaire basé sur l'essai luciférase avec les cellules OP9-DL4 .....	61
2.5. Crible secondaire fonctionnel basé sur la différenciation des DN3 WT .....	62
2.6. Crible secondaire fonctionnel basé sur la survie des DN3 pré-leucémiques.....	62
2.7. Souris .....	63
2.8. Essai de transplantation.....	63
2.9. Analyse des niveaux d'expression des ARNm par PCR quantitative (qPCR).....	64

2.10. Analyse des niveaux d'expression des protéines par immunobuvardage de type western .....	65
2.11. Marquage, montage, et imagerie par immunofluorescence des cellules .....	66
2.12. Visualisation de microdomaines membranaires: les « radeaux lipidiques » par immunofluorescence .....	67
2.13. Marquage et analyse des niveaux de surface des ligands par cytométrie en flux .....	68
2.14. Essai d'adhésion des thymocytes DN sur le stroma de cellules OP9 .....	69
Chapitre 3 .....	71
3. Identification de nouveaux régulateurs des ligands Delta-like1 et 4 et validation dans des événements physio-pathologiques Notch-dépendants .....	72
3.1. Mise au point d'un essai robuste pour identifier de nouveaux régulateurs du ligand Delta-like1 par criblage pan-génomique .....	72
3.2. Résultats du crible primaire et des cribles de confirmation .....	73
3.3. Validation des régulateurs avec le ligand Delta-like4 .....	78
3.4. Crible secondaire fonctionnel basé sur la différenciation des DN3 WT .....	81
3.5. Crible secondaire fonctionnel basé sur la survie des DN3 pré-leucémiques .....	85
3.6. Rôle des régulateurs dans l'activité d'auto-renouvellement des cellules souches pré-leucémiques .....	87
3.7. Classification hiérarchique des régulateurs les plus forts suivant les données d'inhibition de Notch dans les différents cribles .....	89
Chapitre 4 .....	91
4. Caractérisation moléculaire préliminaire de nouveaux régulateurs des ligands de Notch ...	92
4.1. <i>Tmem128</i> : Un nouveau régulateur des ligands à fonction préalablement inconnue .....	92
4.1.1. Confirmation du rôle de <i>Tmem128</i> dans la trans-activation de Notch par translocation du NICD au noyau des cellules réceptrices .....	93
4.1.2. Évaluation de la localisation de TMEM128 dans les cellules OP9-DL1 par immunofluorescence .....	95
4.1.3. Effet de la déplétion de <i>Tmem128</i> sur les niveaux d'expression de <i>Dll1</i> par qPCR .....	97
4.1.4. Effet de la déplétion de <i>Tmem128</i> sur les niveaux d'expression et la protéolyse de DLL1 par immunobuvardage de type western .....	98

4.1.5. Effet de la déplétion de <i>Tmem128</i> sur la localisation sub-cellulaire de DLL1 par immunofluorescence .....	100
4.1.6. Effet de la déplétion de <i>Tmem128</i> sur la distribution de DLL1 dans des microdomaines membranaires: les « radeaux lipidiques » par immunofluorescence.....	102
4.1.7. Conclusions et perspectives .....	104
4.2. <i>Cdc37</i> : Un nouveau régulateur des ligands connu comme contrôlant la stabilité des protéines dans le RE.....	105
4.2.1. Confirmation du rôle de <i>Cdc37</i> dans la trans-activation de Notch par translocation du NICD au noyau des cellules réceptrices .....	106
4.2.2. Effet de la déplétion de <i>Cdc37</i> sur les niveaux d'expression de <i>Dll1</i> par qPCR ..	109
4.2.3. Effet de la déplétion de <i>Cdc37</i> sur les niveaux d'expression et la protéolyse de DLL1 par immunobuvardage de type western.....	111
4.2.4. Effet de la déplétion de <i>Cdc37</i> sur la localisation sub-cellulaire de DLL1 par immunofluorescence .....	113
4.2.5. Effet de la déplétion de <i>Cdc37</i> sur la distribution de DLL1 dans des microdomaines membranaires: les « radeaux lipidiques » par immunofluorescence .....	115
4.2.6. Conclusions et perspectives .....	117
4.3. Rôle des nouveaux régulateurs des ligands dans l'interaction entre les cellules émettrices et les cellules réceptrices .....	118
4.3.1. Effet de la déplétion des régulateurs sur les niveaux de surface de DLL1 par cytométrie en flux .....	118
4.3.2. Effet de la déplétion des régulateurs sur l'adhésion des thymocytes DN sur le stroma de cellules OP9.....	121
4.3.3. Conclusions et Perspectives .....	122
Chapitre 5.....	124
5. Discussion.....	125
5.1. Utilisation des essais luciférases comme outil fiable pour identifier de nouveaux modulateurs de la voie Notch .....	125
5.2. Validation physio-pathologique des nouveaux régulateurs par de puissants essais secondaires fonctionnels .....	132

5.3. Ciblage des ligands dans le microenvironnement tumoral en tant que stratégie thérapeutique émergente .....	137
5.4. Conclusions générales, Impacts, et Perspectives .....	141
Bibliographie.....	145

## Liste des tableaux

<b>Tableau I</b> : Liste des marqueurs de surface caractéristiques de chaque stade de différenciation des thymocytes ou progéniteurs de cellules T. ....	19
<b>Tableau II</b> : Tableau récapitulatif des implications de la voie Notch dans les tumeurs solides et leucémies. ....	28
<b>Tableau III</b> : Liste des amorces utilisées pour les gènes de souris dans les expériences de qPCR. ....	65
<b>Tableau IV</b> : Tableau récapitulatif des phénotypes des 166 gènes validés à partir du crible primaire à essai luciférase. ....	78
<b>Tableau V</b> : Tableau récapitulatif des phénotypes des 80 régulateurs les plus forts du crible secondaire à essai luciférase. ....	80
<b>Tableau VI</b> : Tableau récapitulatif des phénotypes des 46 régulateurs les plus forts du crible secondaire basé sur la différenciation des DN3 WT. ....	84

## Liste des figures

<b>Figure 1 :</b> Représentation schématique simplifiée de l'activation de la voie canonique de Notch.....	8
<b>Figure 2 :</b> Représentation schématique simplifiée du processus d'inhibition latérale. ....	14
<b>Figure 3 :</b> Représentation schématique du processus de développement des cellules T dans le thymus.....	20
<b>Figure 4 :</b> Représentation schématique de la structure des ligands canoniques de Notch à domaine DSL.....	36
<b>Figure 5 :</b> Mise au point du crible primaire à essai luciférase.....	73
<b>Figure 6 :</b> Résultats du crible primaire à essai luciférase.....	75
<b>Figure 7 :</b> Mise au point et résultats du crible secondaire à essai luciférase.....	79
<b>Figure 8 :</b> Mise au point du crible secondaire basé sur la différenciation des DN3 WT.....	82
<b>Figure 9 :</b> Résultats du crible secondaire de confirmation basé sur la différenciation des DN3 WT.....	84
<b>Figure 10 :</b> Mise au point et résultats du crible secondaire basé sur la survie des DN3 pré-leucémiques.....	86
<b>Figure 11 :</b> Évaluation de l'activité d'auto-renouvellement des pré-LSCs.....	88
<b>Figure 12 :</b> Récapitulation des données de criblage.....	90
<b>Figure 13 :</b> Effet de la déplétion de <i>Tmem128</i> sur la translocation du NICD au noyau des cellules HeLa.....	94
<b>Figure 14 :</b> Localisation de TMEM128 dans les cellules OP9-DL1.....	96
<b>Figure 15 :</b> Effet de la déplétion de <i>Tmem128</i> sur l'expression de <i>Dll1</i> .....	97
<b>Figure 16 :</b> Effet de la déplétion de <i>Tmem128</i> sur l'expression et le clivage de DLL1.....	99
<b>Figure 17 :</b> Effet de la déplétion de <i>Tmem128</i> sur la localisation sub-cellulaire de DLL1. ..	101
<b>Figure 18 :</b> Effet de la déplétion de <i>Tmem128</i> sur la localisation de DLL1 aux « radeaux lipidiques ».....	103
<b>Figure 19 :</b> Effet de la déplétion de <i>Cdc37</i> sur la translocation du NICD au noyau des cellules HeLa.....	108
<b>Figure 20 :</b> Effet de la déplétion de <i>Cdc37</i> sur l'expression de <i>Cdc37</i> et de <i>Dll1</i> .....	110

**Figure 21** : Effet de la déplétion de *Cdc37* sur l'expression et le clivage de DLL1. .... 112

**Figure 22** : Effet de la déplétion de *Cdc37* sur la localisation sub-cellulaire de DLL1..... 114

**Figure 23** : Effet de la déplétion de *Cdc37* sur la localisation de DLL1 aux « radeaux lipidiques »..... 116

**Figure 24** : Effet de la déplétion de régulateurs clés des ligands sur les niveaux de DLL1 à la surface cellulaire. .... 120

**Figure 25** : Effet de la déplétion de régulateurs clés des ligands sur l'adhésion des thymocytes DN sur le stroma OP9-DL1. .... 122

**Figure 26** : Profils d'expression génique des régulateurs les plus forts des ligands DSL dans le thymus..... 134

## Liste des sigles et abréviations

Actb : « Actin, beta »

ADAM : « A Disintegrin and Metalloproteinase »

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ADNc : Acide Désoxyribonucléique complémentaire

AKT : « Thymoma viral proto-oncogene »

AMFR : « Autocrine Motility Factor Receptor »

Anapc7: « Anaphase Promoting Complex Subunit 7 »

ANK : « Ankyrin »

APC : Allophycocyanine

Aph1 : « Anterior pharynx-defective 1 »

ARNi : Interférence par l'Acide Ribonucléique

ARNm : Acide Ribonucléique Messenger

ATP : Adénosine Triphosphate

BAP1 : « BRCA1 Associated Protein-1 »

bHLH : « basic Helix-Loop-Helix »

BMP : « Bone Morphogenetic Protein »

BSA : « Bovine Serum Albumin »

°C : Degrés Celsius

C2 : « Calcium-binding motif »

CADASIL : « Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy »

Cbl : « Casitas B-lineage Lymphoma »

CBP/p300 : « CREB (cAMP response element-binding protein)-Binding Protein / E1A binding protein p300 »

CCN3 : « Connective Tissue Growth Factor/Cysteine-rich 61/Nephroblastoma Overexpressed Gene family member »

CCR9 : « C-C chemokine receptor type 9 »

CD : « Cluster of Differentiation »

Cdc37 : « Cell division cycle 37 homolog »  
CDK : « Cyclin-Dependent Kinase »  
*C. elegans* : *Caenorhabditis elegans*  
cGy : centigray  
c-Kit : « Cellular homolog of the Hardy-Zuckerman 4 Feline Sarcoma Viral Oncogene v-Kit »  
CLN8 : « Ceroid-Lipofuscinosis, Neuronal 8 »  
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité  
c-Myc : « Cellular homolog of the Avian Myelocytomatosis Viral Oncogene v-Myc »  
Cnksr3 : « Connector enhancer of kinase suppressor of Ras- family member 3 »  
CO<sub>2</sub> : Dioxyde de Carbone  
CRD : « Cysteine-Rich Domain »  
CSH : Cellule Souche Hématopoïétique  
CSL : « CBF1(C promoter-binding factor 1)/Suppressor of Hairless/LAG-1(Longevity-assurance gene-1) »  
CT-B : « Cholera Toxin subunit-B »  
cTEC : « cortical Thymic Epithelial Cell »  
CTL : Contrôle  
DAPI : 4'-6- Diamidino-2- phénylindole  
DAPT : « (3,5- Difluorophenylacetyl)- L-Alanyl- L-2-Phenylglycine T-butyl ester »  
DAVID : « The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery v6.7 »  
DL1 / Dll1 : Delta-like1  
DL3 / Dll3 : Delta-like3  
DL4 / Dll4 : Delta-like4  
Dlg1 : « human homolog of Drosophila discs large 1 »  
Dlk-1 : « Delta-like 1 homolog »  
DN : Double Négatif  
DNER : « Delta/Notch-like EGF-related Receptor »  
DOS : « Delta and OSM-11-like proteins »  
DP : Double Positif  
DSL : Delta/Serrate/Lag-2  
DUB : Enzyme déubiquitinase

EDTA : Éthylène Diamine Tétra-Acétique  
EGF : « Epidermal Growth Factor »  
EGFL7 : « Epidermal growth factor-like domain 7 »  
eIF3F : « eukaryotic translation initiation factor 3, subunit F »  
ERAD : « Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation »  
ESCRT : « Endosomal Sorting Complex Required for Transport »  
F3 : « Neural Cell Surface Protein F3 »  
Faf : « Fat facets »  
FBS : « Fœtal Bovine Serum »  
Fbxw7 : « F-box/WD repeat-containing protein 7 »  
FCS : « Fœtal Calf Serum »  
FGF : « Fibroblast Growth Factor »  
FLT-3 : « FMS-like tyrosine kinase 3 »  
F-LUC : « Firefly Luciferase »  
g : gramme  
G-CSF : « Granulocyte-Colony Stimulating Factor »  
GFP : « Green fluorescent protein »  
GM1 : « Monosialotetrahexosyl ganglioside »  
GPI : Glycosylphosphatidylinositol  
GSIs : « Gamma-Secretase Inhibitors »  
GSK3 $\beta$  : « Glycogen Synthase Kinase 3 $\beta$  »  
GSL : Glycosphingolipide  
HD : « Heterodimerization domain »  
HeLa : « Henrietta Lacks »  
HEPES : « 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid »  
HER2 : « Human Epidermal growth factor Receptor 2 »  
HES-1 : « Hairy And Enhancer of Split-1 »  
HESR : « Hairy and Enhancer of Split-Related »  
Hprt : « Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase »  
HRP : « Horseradish Peroxidase »  
HSP90 : « 90 kDa Heat Shock Protein »

Hsp90aa1 : « Heat shock protein 90 alpha (cytosolic), class A member 1 »  
Hsp90ab1 : « Heat shock protein 90 alpha (cytosolic), class B member 1 »  
Id3 : « Inhibitor of DNA binding 3 »  
IFM : Intensité de Fluorescence Moyenne  
IL : Interleukine  
JAG1: Jagged 1  
JAG2: Jagged 2  
JAK/ STAT : « Janus kinase/ Signal transducer and activator of transcription »  
Jedi : « Jagged and Delta protein »  
KDa : Kilodalton  
KDEL : Séquence d'acide aminés (lysine, acide aspartique, acide glutamique, leucine)  
LAL-T : Leucémie Aiguë Lymphoblastique des cellules T  
Lgd : « Lethal (2) giant discs »  
Lhx2 : « LIM homeobox protein 2 »  
Lin : « Lineage »  
LMO1 : « LIM domain Only 1 (rhombotin 1) »  
LNR : « Lin12/ Notch Repeats »  
LRF : « Leukemia/Lymphoma Related Factor »  
LSCs : « Leukemic Stem Cells »  
LSK : « Lin<sup>-</sup> ; Sca-1<sup>+</sup> ; c-Kit<sup>+</sup> »  
LTR : « Long Terminal Repeat »  
Lxn : « Latexin »  
MAGI-1 : « Membrane-Associated Guanylate kinase with Inverted domain arrangement-1 »  
MAGP : « Microfibril-Associated Glycoprotein »  
MAML : « Mastermind-Like »  
MAPK : « Mitogen- Activated Protein Kinase »  
MEGF10 : « Multiple EGF-like domains 10 protein »  
mg : milligramme  
Mib : « Mindbomb »  
min : minute  
mL : millilitre

mM : millimolaire  
mm : millimètre  
MMPs : « Matrix Metalloproteinases »  
MOI : « Multiplicity of Infection »  
MSCV : « Murine Stem Cell Virus »  
MT1-MMP : « Membrane Type 1-Matrix Metalloproteinase 1 »  
mTEC : « medullary Thymic Epithelial Cell »  
NB3 : « Neural Recognition Molecule NB3 »  
Ndc80 : « NDC80 homolog, kinetochore complex component »  
NECD : « Notch Extracellular Domain »  
Nedd 4 : « Neural precursor cell Expressed, Developmentally Down-Regulated 4 »  
Neur : « Neuralized »  
NEXT : « Notch Extracellular Truncation »  
ng : nanogramme  
NICD : « Notch Intracellular Domain »  
NK : Cellule naturellement tueuse « Natural killing cell »  
NRR : « Negative Regulatory Region »  
NT : « Non-target »  
otud7b : « OTU deubiquitinase 7B »  
p53 : TP53 « Tumor Protein P53 »  
PAR : « Partitioning- defect »  
PBS : « Phosphate buffered saline »  
PDGF : « Platelet Derived Growth Factor »  
PDZ : « Post synaptic density protein (PSD95), Drosophila disc large tumor suppressor (Dlg), and Zonula occludens-1 protein (ZO-1) »  
Pen2 : « Presenilin enhancer 2 »  
PEST : « Rich in proline (P), glutamic acid (E), serine (S), and threonine (T) »  
PFA : Paraformaldéhyde  
PI3K : Phosphatidyl-inositol 3'-kinase  
Pias1 : « Protein inhibitor of activated STAT 1 »  
PIK3R5 : « Phosphoinositide-3-Kinase, Regulatory Subunit 5 »

PKB : « Protein Kinase B »  
PMP : Progéniteur MultiPotent  
Pofut1 : « Protein O-fucosyltransferase 1 »  
Poglut1 : « Protein O-glucosyltransferase 1 »  
Prdm16 : « PR domain containing 16 »  
pTα : « pre-T cell antigen receptor alpha »  
PTEN : « Phosphatase and tensin homolog »  
PTP : Progéniteur Thymique Précoce  
qPCR : « Quantitative Polymerase Chain Reaction »  
Rab : « Ras analog in brain »  
RAM : « Rbp-associated molecule »  
RBP-J kappa : « Recombination signal Binding Protein-J kappa »  
RE : Réticulum Endoplasmique  
RECK : « Reversion-inducing Cysteine-rich protein with Kazal motifs »  
RING : « Really Interesting New Gene »  
RNAi : « Ribonucleic Acid Interference »  
RPKM : « Reads Per Kilobase per Million mapped reads »  
rpm : tours par minute « revolutions per minute »  
S1 : Site 1  
S2 : Site 2  
S3 : Site 3  
SARA : « Smad Anchor for Receptor Activation »  
Sca : « Scabrous »  
Sca-1 : « Stem Cell Antigen-1 »  
SCL / TAL1 : « Stem Cell Leukemia / T-cell Acute Lymphocytic Leukemia 1 »  
SDS : Dodécylsulfate de sodium  
SDS-PAGE : « Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis »  
SEC : « Skin Epithelial Cell »  
SEM : « Standard Error of the Mean »  
SERPINS : « Serine Protease Inhibitors »  
shARN : Acide ribonucléique en forme de courte épingle à cheveux « short hairpin »

Shh : « Sonic Hedgehog »  
Sparc : « Secreted protein acidic and rich in cysteine »  
SPi : Simple Positif immature  
Su(dx) : « Suppressor of deltex »  
T-ALL : « T-cell Acute Lymphoblastic Leukemia »  
TCR : « T-Cell Receptor »  
TGF- $\beta$  : « Transforming growth factor- $\beta$  »  
TIMP : « Tissue Inhibitor of Metalloproteinases »  
TM : Domaine transmembranaire  
Tmem128 : « Transmembrane protein 128 »  
TMEV : « TIGR Multi-Experiment Viewer »  
TNF  $\alpha$  : « Tumor Necrosis Factor alpha »  
TRC : « The RNAi Consortium »  
TSP2 : « Thrombospondin2 »  
Txn : « Thioredoxin »  
Ube2g2 : « Ubiquitin-conjugating enzyme E2G 2 »  
Ube2i : « Ubiquitin-conjugating enzyme E2I »  
Ube2v2 : « Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 2 »  
uchl3 : « ubiquitin carboxyl-terminal esterase L3 »  
 $\mu$ g : microgramme  
 $\mu$ L : microlitre  
 $\mu$ M : micromolaire  
UPR : « Unfolded Protein Response »  
USP : « Ubiquitin Specific Peptidase »  
V-ATPase : ATPase vacuolaire  
VEGF : « Vascular Endothelial Growth Factor »  
VWFC : « Von Willebrand Factor type C »  
Wnt : « Wingless (Wg) and INT »  
WT : Type sauvage « Wild-Type »  
Xrcc5 : « X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 5 »  
YB1 : « Y-box protein-1 »

*Cette thèse est dédiée à l'âme d'un grand homme, Martin Mouawad, dont le combat a donné un sens différent à mes travaux de recherche.*

## Remerciements

Je tiens d'abord à remercier infiniment mon directeur de recherche, Dr Gregory Emery, pour la formation scientifique qu'il m'a permis d'acquérir au sein de son laboratoire, et pour son support et sa compréhension continus tout le long de mon parcours.

Je remercie aussi nos collaborateurs Dr Trang Hoang et Dr Bastien Gerby, qui ont rendu possible la validation fonctionnelle de cette étude. Merci à Bastien pour les discussions très utiles et pour les techniques et analyses qu'il m'a généreusement apprises.

Un grand merci à Anne-Sophie Guenier et Jean Duchaine de la plateforme de criblage haut-débit de l'Institut de Recherche en Immunologie et Cancérologie de l'Université de Montréal (IRIC), pour la réalisation et l'analyse préliminaire des cribles luciférases.

Merci également à tous les membres actuels et précédents du laboratoire Emery. Je remercie en particulier Sarah Keil et Xavi Rovira qui se sont joints récemment à ce projet, pour leur aide précieuse et pour leurs résultats dont je montre quelques-uns dans le cadre de cette thèse. Merci également à Christelle Ogoudikpe qui m'a formée initialement à la culture cellulaire, à Marie-Elyse Lafaille-Magnan pour sa contribution au projet, et à Étienne Gaucher pour son assistance dans les analyses fonctionnelles des résultats de criblage. Merci aussi à Carl Laflamme pour son amitié et pour l'opportunité de collaboration sur le projet « Evi5 ».

De même, je remercie Dr Martin Baril pour son aide précieuse avec les protocoles d'essais luciférases basés sur la transduction lentivirale de shARNs, Dr Sébastien Lemieux pour son aide avec les analyses statistiques et la détermination des seuils des données de criblage, Dr Dariel Ashton-Beaucage pour son assistance avec le logiciel de classification hiérarchique, et Dr Jalila Chagraoui pour son aide dans la mise au point des essais de cytométrie en flux.

Merci également aux responsables et employés des plateformes technologiques à l'IRIC. Je remercie spécialement Danièle Gagné and Gaël Dulude pour leur assistance en cytométrie en flux, Véronique Litalien pour l'entretien des souris, Jennifer Huber, Pierre Melançon, et Raphaëlle Lambert pour les essais qPCR, et Christian Charbonneau pour son assistance en microscopie.

Je suis extrêmement reconnaissante à la fondation Cole qui a soutenu mes travaux de recherche en m'offrant une bourse doctorale pour la durée de trois ans.

Merci à mes amis pour leur présence à mes côtés dans les moments difficiles et leur écoute. En particulier je remercie Iman Fares, pour les discussions scientifiques très utiles, et pour l'opportunité d'initiation à la dissection des thymus de souris.

Finalement, un grand merci à ma famille pour son soutien permanent. Je remercie mes parents pour leurs infinis sacrifices, ma sœur et sa petite famille pour leur grande affection, et surtout mon frère Guy pour son immense support dès le premier jour, ses innombrables encouragements, et ses analyses statistiques de mes données de criblage.

# Chapitre 1

# 1. Introduction

## 1.1. Voie de signalisation Notch

Tous les processus cellulaires importants pour le développement des organismes pluricellulaires et la fonction des organes sont coordonnés par des mécanismes de communication cellulaire. En effet, les cellules communiquent entre-elles et avec leur environnement via des voies de signalisation composées de signaux chimiques ou de molécules messagères et permettant de transmettre l'information de la surface des cellules vers le noyau ou le cytoplasme. L'information va ainsi être intégrée et traduite en réponses cellulaires bien définies telles que par exemple la division cellulaire ou la migration cellulaire. Malgré la grande diversité des molécules impliquées dans ce processus de communication cellulaire, il existe peu de voies de signalisation qui ont été conservées dans l'évolution entre les différentes espèces animales et qui jouent un rôle clé dans le développement. Celles-ci incluent les voies Wnt « Wingless (Wg) and INT », Shh « Sonic Hedgehog », TGF- $\beta$ / BMP « Transforming growth factor- $\beta$ / Bone morphogenetic protein », PI3K/ AKT « Phosphatidylinositol 3'-kinase/ Thymoma viral proto-oncogene », JAK/ STAT « Janus kinase/ Signal transducer and activator of transcription », et finalement la voie Notch (Gazave, Lapebie et al. 2009, Richards and Degnan 2009).

La voie de signalisation Notch affecte les décisions de destin cellulaire dans de nombreuses espèces métazoaires, où elle joue un rôle crucial dans le maintien des cellules souches, et la régulation de la prolifération et de la différenciation de plusieurs types de lignées cellulaires (Lai 2004). Conformément au rôle fondamental de Notch au cours du développement, des anomalies de cette voie de signalisation mènent à des maladies diverses dans plusieurs types de tissus (Bolos, Grego-Bessa et al. 2007, Talora, Campese et al. 2008).

### 1.1.1. Bref historique

La voie de signalisation Notch a été initialement découverte grâce à des études génétiques chez la mouche *Drosophila melanogaster*, et son appellation est inspirée de l'effet de certains allèles de *Notch* sur le phénotype des ailes: ailes entaillées ou « Notched wings ». Ces entailles dans les ailes des mouches ont été observées en 1914 par John S. Dexter, alors que Thomas Hunt Morgan identifia par la suite les allèles du gène *Notch* (The theory of the gene, Morgan, 1917 et 1928). Le clonage et l'analyse moléculaire du gène *Notch* de *Drosophile* ont été réalisés dans les années 1980 (Artavanis-Tsakonas, Muskavitch et al. 1983, Wharton, Johansen et al. 1985, Kidd, Kelley et al. 1986). Par la suite, les allèles des deux gènes *Notch* de *C. elegans*: *lin-12* et *glp-1* furent aussi identifiés et clonés (Greenwald, Sternberg et al. 1983, Greenwald 1985, Austin and Kimble 1987, Priess, Schnabel et al. 1987). D'autre part, le gène *Delta* fut identifié comme l'une des principales molécules de la voie Notch, particulièrement au cours de la différenciation de l'ectoderme chez la *Drosophile*, où des interactions physiques entre Delta et Notch ont été rapportées (Alton, Fechtel et al. 1989). L'analyse moléculaire du gène *Delta* de *Drosophile* a ainsi révélé plusieurs transcrits maternels et zygotiques (Kopczynski and Muskavitch 1989, Haenlin, Kramatschek et al. 1990). Parallèlement, le gène *Serrate* de *Drosophile* fut aussi identifié comme composant de la voie Notch, et son clonage moléculaire et l'analyse de sa fonction furent réalisés (Fleming, Scottgale et al. 1990).

Depuis la découverte de la voie de signalisation Notch chez la *Drosophile* il y a presque 100 ans, notre compréhension des mécanismes moléculaires régulant cette voie ne cessent de croître. Notamment, des études récentes à l'échelle de tout le génome ont contribué à l'identification de réseaux complexes de gènes régulant l'activité de Notch dans différents organismes (Mummery-Widmer, Yamazaki et al. 2009, Saj, Arziman et al. 2010, Guruharsha, Kankel et al. 2012, Hori, Sen et al. 2014).

## 1.1.2. Mécanismes moléculaires de régulation

L'activation de la voie canonique de Notch requiert l'interaction entre deux cellules adjacentes et la liaison entre un ligand de la famille DSL (Delta/Serrate/Lag-2) et un récepteur Notch; le ligand et le récepteur étant tous les deux des protéines transmembranaires de type I, exprimées à la surface des cellules adjacentes (Figure 1 page 8). Suite à la liaison au ligand, le récepteur Notch subit deux clivages protéolytiques successifs; d'abord par une protéase extracellulaire de la famille ADAM « A Disintegrin and Metalloproteinase » (ADAM10 ou ADAM17) (Bozkulak and Weinmaster 2009), et ensuite par l'enzyme gamma-sécrétase. Ceci conduit à la génération du fragment actif de Notch; le fragment intracellulaire ou NICD « Notch Intracellular Domain » qui va être transloqué au noyau de la cellule exprimant le récepteur (Figure 1) pour réguler l'expression des gènes cibles de Notch suite à la liaison de ce dernier au facteur de transcription CSL « CBF1 (C promoter-binding factor 1) or RBP-J kappa (Recombination signal binding protein-J kappa) / Suppressor of Hairless / LAG-1 (Longevity-assurance gene-1) » et au recrutement du co-activateur MAML1 « Mastermind-like 1 » (Fiuza and Arias 2007). L'élimination du NICD du noyau de la cellule réceptrice et sa dégradation par le protéasome sont régulées de façon temporelle et elles déterminent l'arrêt du signal Notch (Oberg, Li et al. 2001).

### 1.1.2.1. Interactions ligand-récepteur

Le génome de la *Drosophile* code pour un récepteur Notch unique et deux ligands DSL: Delta et Serrate. Par contre, les mammifères possèdent quatre récepteurs Notch: Notch1-4 et cinq ligands DSL: Delta-like1, 3, et 4 (Dll1, 3, et 4), qui sont les homologues de Delta chez la *Drosophile*; et Jagged 1 et 2 (Jag1 et 2), qui sont les homologues de Serrate chez la *Drosophile*. Les interactions ligand-récepteur impliquent le domaine DSL présent dans la région N-terminale ou extracellulaire du ligand, et les domaines EGF-like « Epidermal Growth Factor-like » présents dans la région N-terminale ou extracellulaire du récepteur Notch (Rebay, Fleming et al. 1991, Shimizu, Chiba et al. 1999, Cordle, Redfieldz et al. 2008, Sharma, Rangarajan et al. 2013). Fait intéressant, la structure cristalline des domaines d'interaction du complexe Dll4-Notch1 a été résolue récemment (Luca, Jude et al. 2015).

Afin d'interagir efficacement avec le récepteur Notch, les ligands DSL doivent être ubiquitinés et endocytés dans la cellule émettrice du signal pour trans-activer Notch dans la cellule réceptrice (D'Souza, Miyamoto et al. 2008, Musse, Meloty-Kapella et al. 2012). Deux enzymes E3 ubiquitine ligases; Mib « Mindbomb » et Neur « Neuralized » ont été impliquées dans l'ubiquitination des ligands DSL, tout en ayant une certaine spécificité pour des ligands individuels, et des fonctions particulières suivant les espèces (Weinmaster and Fischer 2011). Les ligands ubiquitinés sont alors internalisés sous l'action d'adaptateurs endocytiques « Epsin-like » (Overstreet, Fitch et al. 2004, Meloty-Kapella, Shergill et al. 2012) pour être par la suite recyclés à la membrane plasmique. Bien que le recyclage des ligands a été démontré comme un mécanisme clé pour la signalisation Notch dans certains contextes (Emery, Hutterer et al. 2005, Heuss, Ndiaye-Lobry et al. 2008), le rôle du recyclage dans l'activation des ligands demeure controversé (Banks, Cho et al. 2011). Toutefois, il est convenu que le processus d'endocytose en général est absolument requis pour la fonction des ligands, par des mécanismes qui seront décrits ultérieurement dans l'introduction. De plus, les ligands subissent un certain nombre de modifications post-traductionnelles ayant des effets variés sur leur interaction avec Notch et sur leur activité de signalisation. Comme la régulation des ligands DSL de Notch fera l'objet de toute la section suivante de l'introduction, nous allons nous concentrer par la suite sur les mécanismes de régulation du récepteur Notch; qui sont d'ailleurs nettement mieux caractérisés dans la littérature que ceux qui régissent l'activation du ligand.

Ainsi, la force des interactions ligand-récepteur pourrait être modulée par des modifications post-traductionnelles du récepteur Notch, notamment par la glycosylation du récepteur. En effet, le domaine extracellulaire de Notch contient des répétitions EGF-like (29-36) qui peuvent être modifiées par l'ajout d'O-glucose ou d'O-fucose (Stanley and Okajima 2010, Ishio, Sasamura et al. 2015). Suite à la modification du récepteur par l'enzyme Pofut1 « Protein O-fucosyltransferase 1 », il peut être glycosylé par l'ajout de N-acétylglucosamine au fragment d'O-fucose, sous l'action de protéines de la famille Fringe, incluant les enzymes Lunatic fringe, Manic fringe, et Radical fringe chez les mammifères. La glycosylation de Notch par Fringe permet de moduler la réponse du récepteur aux différents ligands DSL, favorisant l'interaction avec les ligands de la famille Delta-like par rapport aux ligands de la

famille Jagged (Hicks, Johnston et al. 2000, Kato, Kawaguchi et al. 2010, Taylor, Takeuchi et al. 2014). De même, il a été rapporté que le récepteur Notch peut être glycosylé par d'autres enzymes comme Rumi ou Poglut1 « Protein O-glucosyltransferase 1 » (Acar, Jafar-Nejad et al. 2008, Fernandez-Valdivia, Takeuchi et al. 2011), et par deux enzymes de la famille de la glycosyltransférase 8 humaine (Sethi, Buettner et al. 2010). Plusieurs études visent encore à élucider les conséquences fonctionnelles de ces modifications de Notch par glycosylation (Takeuchi and Haltiwanger 2014).

Alors que les interactions en trans entre un ligand et un récepteur Notch exprimés sur deux cellules voisines conduisent à une activation du signal Notch tel que décrit ci-haut, il a été démontré que des interactions en cis entre des molécules de ligand et de récepteur exprimés sur la même cellule conduisent à une inhibition de la signalisation (Sprinzak, Lakhanpal et al. 2010, del Alamo, Rouault et al. 2011). En effet, l'intégration des interactions en cis et en trans dépend de la concentration du ligand et elle définit la direction de la signalisation Notch, en déterminant l'identité de la cellule émettrice et de la cellule réceptrice du signal, affectant ainsi les décisions de destin cellulaire au cours du développement (Sprinzak, Lakhanpal et al. 2010). Les mécanismes moléculaires de la cis-inhibition sont variés et font l'objet de nombreuses études. Il a été montré par exemple que la cis-inhibition conduit à une réduction des niveaux de surface du récepteur Notch (Perez, Milan et al. 2005, Matsuda and Chitnis 2009), ou empêche la libération du domaine extracellulaire de Notch résultant du clivage par ADAM (Fiuza, Klein et al. 2010). Ceci entraîne une réduction de l'expression des gènes cibles de Notch de façon cellule-autonome. En contrepartie, la cis-inhibition peut survenir dans la cellule exprimant le ligand, où elle implique une inhibition du ligand par le domaine extracellulaire de Notch exprimé par la même cellule, conduisant à une réduction des niveaux de surface du ligand disponible pour trans-activer le récepteur Notch sur les cellules environnantes (Becam, Fiuza et al. 2010). Finalement, il a été démontré récemment que les interactions en cis sont aussi capables d'inhiber la signalisation Notch ligand-indépendante *in vivo*, durant l'ovogenèse chez la *Drosophila* (Palmer, Jia et al. 2014).

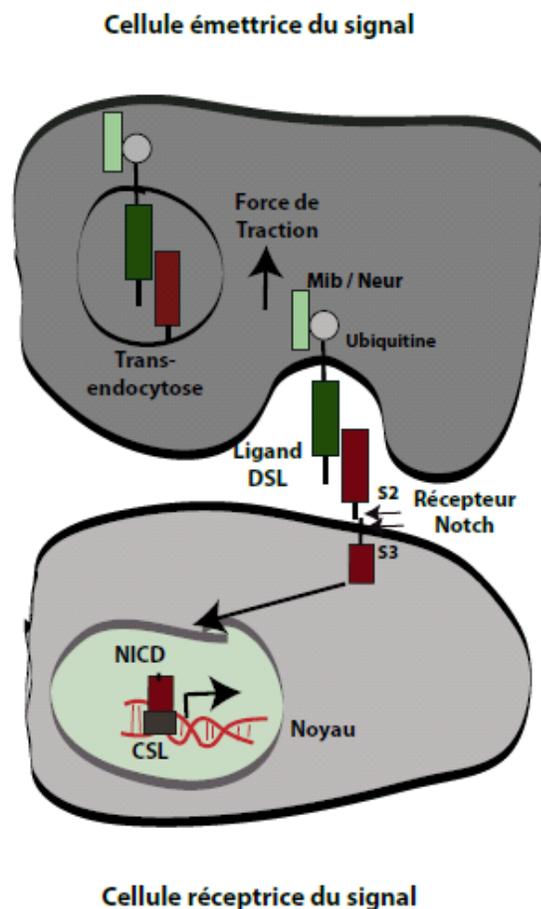
### 1.1.2.2. Clivages protéolytiques du récepteur Notch

Le récepteur Notch est synthétisé sous forme d'un précurseur qui est clivé dans le Golgi par une furine sur un site 1 (S1) au cours de sa maturation (Logeat, Bessia et al. 1998). Ceci aboutit à la formation d'un hétérodimère Notch constitué de deux sous-unités liées de manière non-covalente: une sous-unité extracellulaire, et une sous-unité transmembranaire. L'hétérodimère Notch est ainsi adressé à la membrane plasmique où il pourra interagir avec un ligand DSL exprimé sur une cellule adjacente.

Suite à l'interaction avec son ligand, le récepteur Notch est trans-activé, et il subit deux clivages protéolytiques successifs: le clivage au site 2 (S2), et le clivage au site 3 (S3). En effet, la liaison au ligand va exercer une force mécanique de traction sur l'hétérodimère Notch (Figure 1 page 8), entraînant un changement conformationnel du récepteur, qui va conduire au dépliement de la région de régulation négative (NRR) « Negative Regulatory Region » comprenant les domaines LNR « Lin12/ Notch Repeats » et HD « Heterodimerization domain » de Notch, et à l'exposition du site de clivage S2 reconnu par les enzymes de la famille ADAM. Il a été démontré que plusieurs enzymes ADAM peuvent être impliquées dans le clivage S2 de Notch (Brou, Logeat et al. 2000, Tian, Wu et al. 2008, Tousseyn, Thathiah et al. 2009, van Tetering, van Diest et al. 2009, Canault, Certel et al. 2010), qui va entraîner la libération du domaine extracellulaire du récepteur (NECD) « Notch Extracellular Domain », et sa trans-endocytose dans la cellule exprimant le ligand (Parks, Klueg et al. 2000, Nichols, Miyamoto et al. 2007, Hansson, Lanner et al. 2010).

D'autre part, le domaine transmembranaire de Notch (NEXT) « Notch Extracellular Truncation » résultant du clivage S2, va subir une protéolyse intramembranaire au site S3 par le complexe de l'enzyme gamma-sécrétase afin de générer le fragment intracellulaire (NICD) (De Strooper, Annaert et al. 1999, Ray, Yao et al. 1999, Song, Nadeau et al. 1999, Struhl and Greenwald 1999). La gamma-sécrétase est une protéase formée de plusieurs sous-unités incluant: préséniline, nicastrine, Pen2 « Presenilin enhancer 2 », et Aph1 « Anterior pharynx-defective 1 » (Jorissen and De Strooper 2010). Alors que la préséniline constitue la sous-unité catalytique du complexe de la gamma-sécrétase, il a été rapporté que la sous-unité nicastrine n'est pas nécessaire pour le clivage de Notch, mais plutôt pour la stabilité du complexe (Zhao, Liu et al. 2010). De plus, il a été démontré que l'activité de l'enzyme gamma-sécrétase est

régulée non seulement par ses sous-unités, mais aussi par plusieurs autres protéines et événements cellulaires (Chen, Hasegawa et al. 2006, Zhou, Zhou et al. 2006, Gertsik, Chiu et al. 2014, Marinangeli, Tasiaux et al. 2015). Finalement, le clivage S3 de Notch par la gamma-sécrétase peut survenir à différentes positions, affectant potentiellement la durée de la signalisation Notch. Ainsi, les fragments NICD issus du clivage S3 possèdent soit un résidu valine, ou un résidu sérine/leucine en position N-terminale. Il a été montré que les fragments à résidu sérine/leucine présentent une demi-vie plus courte que ceux à résidu valine (Tagami, Okochi et al. 2008).



**Figure 1 :** Représentation schématique simplifiée de l'activation de la voie canonique de Notch.

### 1.1.2.3. Endocytose et trafic du récepteur Notch

Le processus d'endocytose joue un rôle crucial dans l'activation de la voie Notch (Emery and Knoblich 2006, Baron 2012, Kandachar and Roegiers 2012), et l'endocytose du récepteur en soi constitue une étape importante pour la signalisation. Il a même été rapporté que la majorité du clivage par gamma-sécrétase, qui conduit à la libération du fragment actif de Notch, a lieu après internalisation du récepteur (Vaccari, Lu et al. 2008), malgré le fait que Notch interagisse initialement avec le complexe de la gamma-sécrétase au niveau de la membrane plasmique (Hansson, Stromberg et al. 2005). Conformément à ces données, il a été démontré que la pompe à protons v-ATPase (ATPase vacuolaire), qui est importante pour l'acidification des endo-lysosomes, est requise pour l'activation de Notch par la gamma-sécrétase (Vaccari, Duchi et al. 2010, Lange, Prenninger et al. 2011, Valapala, Hose et al. 2013). Cependant, il y a d'autres études qui montrent, au contraire, que la protéolyse de Notch par gamma-sécrétase a lieu à la surface de la cellule (Tarassishin, Yin et al. 2004, Kaether, Schmitt et al. 2006, Sorensen and Conner 2010), ce qui suggère que la localisation du clivage S3 pourrait être variable dépendamment du contexte cellulaire (Tagami, Okochi et al. 2008).

L'endocytose du récepteur Notch est précédée par sa mono-ubiquitination au niveau de la lysine 1749 (Gupta-Rossi, Six et al. 2004). À date, il existe deux enzymes dé-ubiquitinases qui ont été démontrées comme agissant directement sur le récepteur Notch: eIF3F « eukaryotic translation initiation factor 3, subunit F » et USP12 « Ubiquitin Specific Peptidase 12 ». La dé-ubiquitination de Notch par eIF3F constitue un régulateur positif de la signalisation parce qu'elle serait requise pour le clivage de Notch par la gamma-sécrétase (Moretti, Chastagner et al. 2010). Par contre, la dé-ubiquitination de Notch par USP12 constitue un régulateur négatif de la signalisation, et la déplétion d'USP12 inhiberait le trafic de Notch aux lysosomes, conduisant à une élévation des niveaux de surface du récepteur et à une augmentation de son activité (Moretti, Chastagner et al. 2012). D'autre part, l'ubiquitination de Notch sous l'action de plusieurs enzymes E3 ubiquitine ligases comme Itch ou Su(dx) « Suppressor of deltex », Nedd4 « Neural precursor cell Expressed, Developmentally Down-Regulated 4 », et Cbl « Casitas B-lineage Lymphoma » entraîne l'adressage du récepteur à la dégradation (Jehn,

Dittert et al. 2002, Sakata, Sakaguchi et al. 2004, Wilkin, Carbery et al. 2004). En contrepartie, l'enzyme E3 ubiquitine ligase Deltex est impliquée dans la régulation du clivage et de l'internalisation de Notch (Diederich, Matsuno et al. 1994, Matsuno, Diederich et al. 1995, Hori, Fostier et al. 2004, Wilkin, Tongngok et al. 2008, Yamada, Fuwa et al. 2011), et elle contrôle aussi l'activation ligand-indépendante de Notch au niveau de l'endosome tardif (Hori, Fostier et al. 2004, Hori, Fuwa et al. 2005). Néanmoins, Deltex peut aussi former un complexe avec l'arrestine non-visuelle Kurtz pour promouvoir la dégradation de Notch (Mukherjee, Veraksa et al. 2005). Ainsi Deltex a été décrite à la fois comme un régulateur positif (Matsuno, Diederich et al. 1995, Matsuno, Ito et al. 2002, Fuwa, Hori et al. 2006, Wilkin, Tongngok et al. 2008) ou négatif (Sestan, Artavanis-Tsakonas et al. 1999, Mukherjee, Veraksa et al. 2005) de la signalisation Notch dépendamment de ses interactions avec d'autres facteurs de régulation.

D'autre part, des régulateurs de l'endocytose comme le complexe adaptateur pour la clathrine (AP-1), qui est localisé au niveau du trans-golgi et de l'endosome de recyclage, jouent un rôle dans la régulation du trafic du récepteur Notch et de son activité (Benhra, Lallet et al. 2011, Kametaka, Kametaka et al. 2012). De plus, l'adaptateur endocytique Numb est un régulateur négatif bien caractérisé de la signalisation Notch en *Drosophile*, comme en mammifères (Uemura, Shepherd et al. 1989, Rhyu, Jan et al. 1994, Zhong, Jiang et al. 1997, Cayouette, Whitmore et al. 2001, Cayouette and Raff 2002, Gonczy 2008, Beres, George et al. 2011, El-Hashash, Turcatel et al. 2011, Kechad, Jolicoeur et al. 2012, Zhao, Guo et al. 2014). Numb antagonise le récepteur Notch en recrutant l'ubiquitine ligase Itch afin de promouvoir sa dégradation (McGill, Dho et al. 2009, Beres, George et al. 2011), ou en régulant les voies de trafic et d'adressage du récepteur suite à son endocytose (McGill, Dho et al. 2009, Couturier, Mazouni et al. 2013). Il a été récemment démontré que Notch, à son tour, peut affecter la distribution de Numb dans les précurseurs de cellules neuronales, par un mécanisme de régulation rétroactive (Bhat 2014). En outre, la protéine transmembranaire de *Drosophile* Sanpodo est un régulateur important du trafic et de l'activité de Notch, et elle interagit à la fois avec Numb et le récepteur Notch (O'Connor-Giles and Skeath 2003, Cotton, Benhra et al. 2013, Couturier, Trylinski et al. 2014), favorisant la signalisation Notch en l'absence de Numb, et réprimant la signalisation Notch en présence de Numb (Babaoglan, O'Connor-Giles et al.

2009, Upadhyay, Kandachar et al. 2013). De même, une perturbation du trafic du récepteur Notch conduit à son accumulation anormale dans des compartiments d'endocytose: les corps multivésiculaires dans le cas de mutants de composants du complexe *ESCRT* « *Endosomal Sorting Complex Required for Transport* », et le lysosome dans le cas de mutants du gène *Lgd* « *Lethal (2) giant discs* ». Dans les deux cas, ce processus conduit à une activation ectopique de Notch de manière ligand-indépendante (Childress, Acar et al. 2006, Jaekel and Klein 2006, Vaccari, Lu et al. 2008, Aoyama, Yamakawa et al. 2013, Schneider, Troost et al. 2013, Cheruiyot, Lee et al. 2014). Finalement, une voie d'endocytose spécialisée via les endosomes SARA « Smad Anchor for Receptor Activation » empruntée à la fois par le récepteur Notch et le ligand Delta a été rapportée comme jouant un rôle dans la régulation différentielle de la signalisation Notch (Coumailleau, Furthauer et al. 2009, Loubery, Seum et al. 2014, Montagne and Gonzalez-Gaitan 2014, Kressmann, Campos et al. 2015).

#### **1.1.2.4. Régulation du domaine intracellulaire de Notch**

Tel que mentionné plus haut, le NICD forme un complexe nucléaire avec CSL et MAML pour activer la transcription des gènes cibles de Notch (Kovall and Blacklow 2010). En effet, suite à l'activation du récepteur, le fragment NICD est transloqué au noyau où il se lie, via son domaine RAM « Rbp-associated molecule », au facteur de transcription CSL. Ceci permet le déplacement des co-répresseurs constitutivement associés au CSL (Schweisguth and Posakony 1994, Zhou, Fujimuro et al. 2000, Zhou and Hayward 2001, Barolo, Stone et al. 2002, Oswald, Winkler et al. 2005) et le recrutement du co-activateur MAML à l'interface entre le domaine ANK « Ankyrin » de NICD et le CSL (Choi, Wales et al. 2012). La structure cristalline du complexe ternaire CSL-NICD-MAML lié à l'ADN a été résolue, et elle suggère un mécanisme de conversion du CSL d'un répresseur à un activateur de transcription par un changement conformationnel suivant sa liaison au NICD (Wilson and Kovall 2006). Ce complexe ternaire recrute d'autres co-activateurs comme par exemple les acétyltransférases d'histones CBP/p300 « CREB (cAMP response element-binding protein)- Binding Protein / E1A binding protein p300 » et des complexes de remodelage de la chromatine, favorisant la transcription des gènes cibles de Notch (Wallberg, Pedersen et al. 2002, Kadam and Emerson

2003, Gause, Eissenberg et al. 2006). La phosphorylation du NICD par des kinases comme GSK3 $\beta$  « Glycogen Synthase Kinase 3 $\beta$  », G-CSF « Granulocyte-Colony Stimulating Factor », et CDK8 « Cyclin-Dependent Kinase 8 » (Ingles-Esteve, Espinosa et al. 2001, Espinosa, Ingles-Esteve et al. 2003, Fryer, White et al. 2004) permet de réguler sa stabilité et par conséquent son activité. Ainsi, le NICD phosphorylé est ensuite ubiquitiné au niveau de son domaine PEST (riche en proline (P), acide glutamique (E), sérine (S), et thréonine (T)), sous l'action de l'enzyme E3 ubiquitine ligase Fbxw7 « F-box/WD repeat-containing protein 7 » ou Sel-10 afin d'être dégradé au protéasome, mettant fin à la signalisation (Gupta-Rossi, Le Bail et al. 2001, Oberg, Li et al. 2001, Tsunematsu, Nakayama et al. 2004). Finalement, il a été démontré que le NICD peut aussi être l'objet d'autres modifications comme l'hydroxylation (Coleman, McDonough et al. 2007, Zheng, Linke et al. 2008) et l'acétylation/dé-acétylation (Guarani, Deflorian et al. 2011), ce qui affecterait son activité de signalisation.

### **1.1.3. Rôles au cours du développement**

#### **1.1.3.1. Diversité fonctionnelle durant le développement**

La voie de signalisation Notch joue un rôle pléiotropique au cours du développement des organismes multicellulaires, où elle affecte les décisions de destin cellulaire dans presque tous les types de tissus. Cette diversité fonctionnelle de Notch est principalement due à la diversité des programmes d'expression génique activés par le complexe transcriptionnel « CSL-NICD-MAML », dépendamment du contexte cellulaire (Andersson, Sandberg et al. 2011). En effet, l'activation de la transcription en aval du NICD est finement régulée de façon spatio-temporelle dans chaque lignée cellulaire, où des gènes différents sont induits en parallèle aux gènes HESR « Hairy and Enhancer of Split-Related » qui constituent les gènes cibles traditionnels de Notch et qui codent pour des répresseurs transcriptionnels de la famille bHLH « basic helix-loop-helix » (Bray 2006, Kopan and Ilagan 2009).

D'autre part, l'interaction de la voie Notch avec d'autres voies de signalisation impliquées dans le développement, comme par exemple les voies Ras/MAPK, Wnt, et TGF-

$\beta$ /BMP contribue également à sa diversité fonctionnelle dans différents événements physiologiques et pathologiques (Hansson, Lendahl et al. 2004, Andersson, Sandberg et al. 2011). Ceci permet l'intégration de la voie Notch à des complexes de signalisation où les voies de signalisation sont inter-régulées au niveau de l'interaction directe entre leurs composants, ou de la régulation de l'expression de leurs composants, ou du contrôle des niveaux de transcription de leurs gènes cibles (Andersson, Sandberg et al. 2011).

#### **1.1.3.2. Rôle dans les cellules souches**

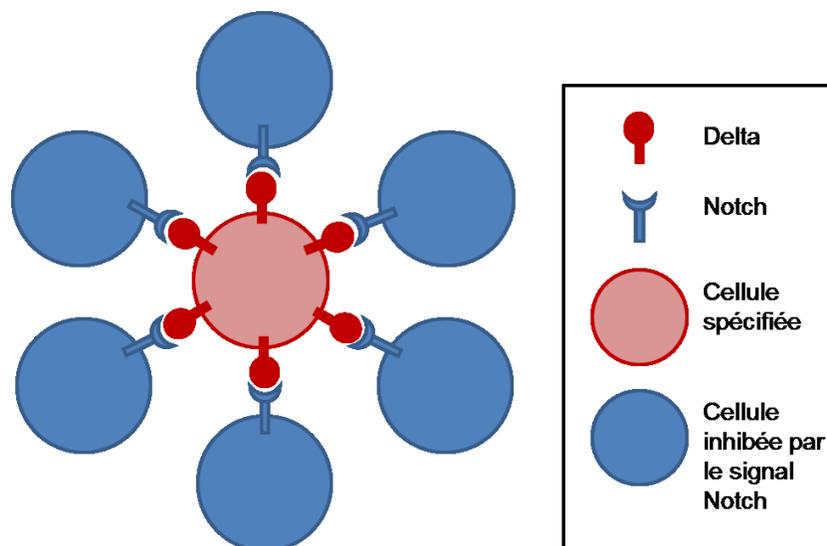
La voie Notch, tout comme d'autres voies de signalisation importantes pour le développement, joue un rôle clé dans l'auto-renouvellement des cellules souches. Les cellules souches sont des cellules indifférenciées, indispensables au développement embryonnaire, ainsi qu'à l'homéostasie des tissus adultes et leur réparation post-traumatique. Elles sont caractérisées par leur potentiel simultané d'auto-renouvellement et de différenciation en un ou plusieurs types cellulaires. En effet, les cellules souches peuvent se multiplier suivant un mode de division symétrique leur permettant d'amplifier leur population, ou suivant un mode de division asymétrique leur permettant de se différencier tout en maintenant leur homéostasie par auto-renouvellement. Au cours du processus de division asymétrique des cellules souches, une signalisation Notch différentielle induit des différences d'identités cellulaires entre les deux cellules-filles issues de la division, de façon à ce qu'une cellule conserve le potentiel de renouvellement de la cellule souche, alors que l'autre cellule subit un processus de différenciation (Betschinger and Knoblich 2004, Gonczy 2008).

Ainsi, l'activation de la voie Notch est associée aux stades précoces de développement des lignées cellulaires, où elle est impliquée dans la différenciation, le maintien, et la prolifération des cellules souches dans un très grand nombre de tissus; incluant l'intestin, le système hématopoïétique, les muscles, le système nerveux, les lignées germinales, et divers tissus épithéliaux et mésenchymateux (Liu, Sato et al. 2010).

### 1.1.3.3. Événements physiologiques Notch-dépendants

La liste des événements physiologiques régulés par la voie Notch au cours du développement, en concert ou non avec d'autres voies de signalisation, est très longue. Nous allons énumérer par la suite quelques-uns des plus importants processus Notch-dépendants.

**L'inhibition latérale** constitue un processus de morphogenèse caractéristique de la signalisation Notch dans diverses lignées cellulaires, où les cellules en voie de spécification ou d'acquisition d'un destin cellulaire spécifique influencent à leur tour les cellules voisines pour les empêcher d'adopter le même destin cellulaire (Figure 2). Ce mécanisme permet ainsi à la voie Notch de contribuer à la ségrégation de lignées spécifiques à partir d'un groupe de cellules équivalentes (Greenwald 1998). Un exemple typique d'inhibition latérale Notch-dépendante est illustré par la différenciation des neuroblastes dans la région neurogénique de l'embryon au cours du développement de la *Drosophile*. Dans ce cas, une cellule qui est en train de se spécifier en neuroblaste empêche les cellules environnantes d'adopter le même destin. Ainsi, les mouches mutantes pour *Notch* présentent un phénotype « neurogénique » caractéristique, où le nombre des neurones est surélevé aux dépens de l'épiderme, suite à un défaut d'inhibition latérale (Heitzler and Simpson 1991).



**Figure 2 :** Représentation schématique simplifiée du processus d'inhibition latérale.

Au niveau du **système nerveux central**, Notch est impliqué dans le maintien des cellules souches, l'équilibre entre la neurogenèse et la gliogenèse, et la polarité des cellules neuro-épithéliales (Ohata, Aoki et al. 2011, Yao, Cao et al. 2013).

Au niveau du **système cardio-vasculaire**, Notch régule d'un côté la structuration cardiaque, la différenciation des cardiomyocytes, le développement des valves, et la trabéculatation ventriculaire (MacGrogan, Nus et al. 2010, Zhou and Liu 2014); et d'un autre côté la spécification et la différenciation artérioveineuse dans les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses vasculaires, ainsi que la germination et la ramification des vaisseaux sanguins (Gridley 2010, Fouillade, Monet-Lepretre et al. 2012, Tung, Tattersall et al. 2012).

Au niveau du **système musculaire**, Notch favorise la transition des cellules satellites activées en précurseurs de cellules myogéniques et myoblastes, et empêche la différenciation des myoblastes en myotubes suite à une lésion (Tsivitse 2010).

Au niveau des **poumons**, Notch régule la morphogenèse et la ramification de la trachée par inhibition latérale, l'alvéogenèse, le développement des vaisseaux pulmonaires, et la spécification du destin des cellules épithéliales des voies aériennes (Ghabrial and Krasnow 2006, Xu, Moghal et al. 2012).

Au niveau du **foie**, Notch régule la formation de la plaque ductale et la morphogenèse des canaux biliaires intra-hépatiques (Lozier, McCright et al. 2008, Zong and Stanger 2011).

Au niveau des **reins**, Notch définit le destin cellulaire des podocytes et des tubules proximaux (Cheng, Kim et al. 2007, Barak, Surendran et al. 2012).

Au niveau du **pancréas**, Notch régule la spécification des cellules endocrines par un mécanisme d'inhibition latérale, ainsi que le maintien des précurseurs endocrines pancréatiques et l'inhibition de la différenciation terminale des cellules acineuses. Notch contrôle aussi la ramification de l'épithélium pancréatique et la taille des bourgeons pancréatiques (Kim, Shin et al. 2010, Afelik and Jensen 2013).

Au niveau du **système gastro-intestinal**, Notch régule le choix d'identité cellulaire entre les cellules luminales et glandulaires de l'estomac d'une part (Matsuda, Wakamatsu et al. 2005, Khurana and Mills 2010), et d'autre part entre les cellules absorbantes et sécrétoires de l'intestin (Heath 2010, Fre, Bardin et al. 2011).

Au niveau des **glandes mammaires**, Notch régule la fonction des cellules souches mammaires, le développement alvéolaire pendant la grossesse, ainsi que le maintien des cellules luminales, et limite la prolifération excessive des cellules basales (Buono, Robinson et al. 2006, Ercan, van Diest et al. 2011).

Au niveau de la **prostate**, Notch régule la différenciation et la prolifération des cellules épithéliales, ainsi que la différenciation et la survie du stroma (Wang, Shou et al. 2004, Wang, Leow et al. 2006, Orr, Grace et al. 2009).

Au niveau de la **peau**, Notch régule la différenciation de l'épiderme, l'adhésion cellulaire, ainsi que la différenciation et l'homéostasie des follicules pileux (Watt, Estrach et al. 2008, Rishikaysh, Dev et al. 2014).

Au niveau des **os**, Notch régule la différenciation des chondrocytes, ostéoblastes, et ostéoclastes, ainsi que le développement des structures cranio-faciales (Loomes, Stevens et al. 2007, Regan and Long 2013, Ma, Wu et al. 2015).

Finalement, au niveau du **système hématopoïétique**, Notch régule la deuxième vague d'hématopoïèse au cours du développement, le maintien des cellules souches hématopoïétiques, le maintien de l'homéostasie myéloïde (Bigas, Robert-Moreno et al. 2010), ainsi que de nombreuses décisions de destins cellulaires et de développements dans la lignée lymphoïde. Celles-ci comprennent l'équilibre entre le développement des cellules B et celui des cellules T, le développement des cellules B de la zone marginale dans la rate (Yuan, Kousis et al. 2010), et le développement des cellules T dans le thymus (Yashiro-Ohtani, Ohtani et al. 2010, Thompson and Zuniga-Pflucker 2011).

#### 1.1.3.4. Importance de la voie Notch dans le développement des cellules T

L'auto-renouvellement et la différenciation des cellules souches hématopoïétiques (CSHs) est nécessaire pour la régénération de toutes les lignées cellulaires sanguines le long de la vie. Alors que la différenciation des cellules B et des cellules myéloïdes est initiée dans la moelle osseuse, celle des cellules T commence dans le thymus, suggérant que ce dernier fournit un microenvironnement spécialisé pour assurer la spécification des cellules T et leur développement (Ciofani and Zuniga-Pflucker 2007, Griffith, Fallahi et al. 2009, St-Pierre, Brochu et al. 2013). Dans ce contexte, la signalisation Notch est nécessaire pour réguler l'équilibre optimal entre la différenciation des cellules T et celle des cellules B, et pour assurer le développement des cellules T dans le thymus. En effet, l'inactivation de la signalisation Notch dans les CSHs ou dans les progéniteurs hématopoïétiques multipotents (PMPs) de la moelle osseuse résulte en une production intra-thymique de cellules B et inhibe la différenciation des cellules T (Radtke, Wilson et al. 1999, Wilson, MacDonald et al. 2001, Han, Tanigaki et al. 2002, Maillard, Weng et al. 2004). Par contre, l'activation constitutive de la signalisation Notch inhibe le développement des cellules B et favorise la production extra-thymique de cellules T (Pui, Allman et al. 1999, De Smedt, Reynvoet et al. 2002, Hozumi, Abe et al. 2003). À noter que la signalisation Notch est requise pour la différenciation des cellules T à la fois dans les systèmes hématopoïétiques murin et humain (Taghon 2009).

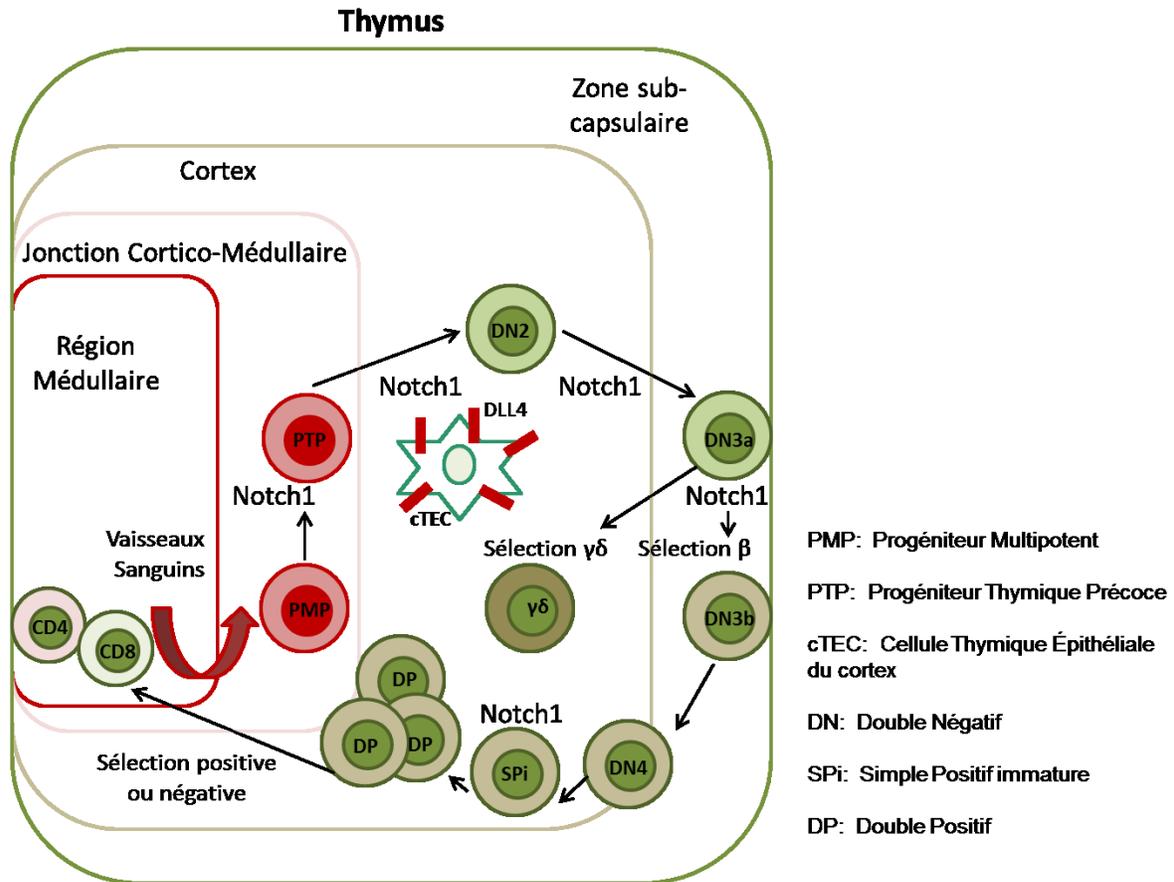
Le processus de développement des cellules T (Figure 3 page 20) débute quand des PMPs issus de la moelle osseuse, et exprimant le récepteur de chimiokines CCR9 « C-C chemokine receptor type 9 » colonisent le thymus. Ces PMPs de type LSK « Lin<sup>-</sup> (Lineage<sup>-</sup>); Sca-1<sup>+</sup> (Stem cell antigen-1<sup>+</sup>) ; c-Kit<sup>+</sup> (Cellular homolog of the Hardy-Zuckerman 4 Feline Sarcoma Viral Oncogene v-Kit<sup>+</sup>) » effectuent par la suite une série d'événements de migrations intra-thymiques associés à leur maturation graduelle, et modulés par une intégration entre les signaux de chimiokines et l'interaction avec des composants de la matrice extracellulaire (Porritt, Gordon et al. 2003, Yin, Chtanova et al. 2006, Petrie and Zuniga-Pflucker 2007, Gameiro, Nagib et al. 2010). Ainsi les PMPs qui pénètrent dans la région cortico-médullaire du thymus à partir de la circulation sanguine vont se spécifier en progéniteurs thymiques précoces (PTPs) qui vont par la suite migrer au cortex thymique où ils vont se différencier en progéniteurs de cellules T ou thymocytes doubles négatifs caractérisés

par l'absence des deux marqueurs CD4 et CD8 ( $CD4^-$  ;  $CD8^-$ ). La spécification des PTPs et la différenciation des DN requièrent la signalisation Notch ligand-dépendante, impliquant une interaction entre le récepteur Notch1 exprimé par les progéniteurs hématopoïétiques, et le ligand Dll4 exprimé par les cellules thymiques épithéliales du cortex (cTEC) (Hozumi, Mailhos et al. 2008). À leur tour, les DN vont migrer à la zone subcapsulaire du thymus où ils vont réarranger leurs gènes TCR « T-Cell Receptor », favorisant la sélection  $\beta$  ou  $\gamma\delta$  par l'intermédiaire de signaux pré-TCRs  $\alpha\beta$  ou de signaux TCRs  $\gamma\delta$  respectivement (Taghon, Yui et al. 2006). Les DN comprennent quatre sous-populations distinctes exprimant des marqueurs de surface différents, et nommées DN1 à DN4; du stade le plus immature au stade le plus différencié (voir Tableau I ci-dessous). Les thymocytes DN1 et DN2 qui ne reçoivent pas suffisamment de signaux Notch1 gardent toujours le potentiel de se développer en cellules B, cellules myéloïdes, mastocytes, et cellules NK « Natural killing cells » (Allman, Sambandam et al. 2003, Bell and Bhandoola 2008, Rothenberg, Moore et al. 2008, Feyerabend, Terszowski et al. 2009). Par contre, les thymocytes DN3 sont déjà spécifiés en cellules T, et ils sont caractérisés par l'expression des récepteurs pré-TCRs à leur surface cellulaire et par le processus de  $\beta$ -sélection (Taghon, Yui et al. 2006). Les thymocytes DN3 qui ne réussissent pas à réarranger des gènes pré-TCRs fonctionnels meurent, alors que ceux qui reçoivent des signaux pré-TCRs  $\alpha\beta$  fonctionnels vont proliférer et se différencier en doubles positifs (DP) ( $CD4^+$  ;  $CD8^+$ ), via des intermédiaires DN4 et SPi (Simples Positifs immatures). Au stade DN3, bien que la signalisation Notch ne soit plus requise pour la spécification des cellules T, elle reste néanmoins nécessaire à la survie des thymocytes DN3 avant la  $\beta$ -sélection (Wolfer, Wilson et al. 2002, Schmitt, Ciofani et al. 2004, Tanigaki, Tsuji et al. 2004, Maillard, Tu et al. 2006). De plus, la signalisation par Notch1 demeure toujours active au-delà du stade DN3 où elle joue un rôle métabolique important (Schmitt, Ciofani et al. 2004, Ciofani and Zuniga-Pflucker 2005, Ciofani, Knowles et al. 2006), et où elle est nécessaire pour générer un nombre optimal de cellules T de type DP suivant la  $\beta$ -sélection (Garbe, Krueger et al. 2006).

Type de thymocytes	Marqueurs de surface
PTP ou DN1	c-Kit <sup>+</sup> ; CD44 <sup>+</sup> ; CD25 <sup>-</sup>
DN2	c-Kit <sup>+</sup> ; CD44 <sup>+</sup> ; CD25 <sup>+</sup>
DN3	c-Kit <sup>-</sup> ; CD44 <sup>-</sup> ; CD25 <sup>+</sup>
DN4	c-Kit <sup>-</sup> ; CD44 <sup>-</sup> ; CD25 <sup>-</sup>
DP	CD4 <sup>+</sup> ; CD8 <sup>+</sup>

**Tableau I :** Liste des marqueurs de surface caractéristiques de chaque stade de différenciation des thymocytes ou progéniteurs de cellules T.

Les DP migrent de nouveau au cortex et se différencient en simples positifs: CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup> suite aux sélections positive et négative impliquant des interactions de leurs TCR  $\alpha\beta$  avec des complexes CMH-peptides (Complexes Majeurs d'Histocompatibilité-peptides) des TECs, permettant ainsi leur maturation fonctionnelle (Dyall and Nikolic-Zugic 1995, Anderson, Venanzi et al. 2002, Boursalian, Golob et al. 2004). D'autre part, les thymocytes qui reçoivent des signaux TCRs  $\gamma\delta$  fonctionnels survivent et se différencient en cellules T  $\gamma\delta$  (CD4<sup>-</sup> ; CD8<sup>-</sup>), dont le répertoire de TCRs est moins diversifié que celui des cellules T  $\alpha\beta$  (Taghon and Rothenberg 2008). Les cellules T  $\alpha\beta$  sont localisées le long des organes lymphoïdes périphériques. Par contre, les cellules T  $\gamma\delta$  se retrouvent dans des sites épithéliaux comme l'intestin et la peau. Alors que la signalisation Notch est requise pour la différenciation des cellules T  $\alpha\beta$ , elle semble moins importante pour celle des cellules T  $\gamma\delta$  chez la souris (Tanigaki, Tsuji et al. 2004, Maillard, Tu et al. 2006). Contrairement au modèle murin, Notch semble jouer un rôle important dans le développement des cellules T  $\gamma\delta$  humaines où des niveaux plus élevés de Notch favorisent le développement des cellules T  $\gamma\delta$  par rapport à celui des cellules T  $\alpha\beta$  (Van de Walle, De Smet et al. 2009).



**Figure 3 :** Représentation schématique du processus de développement des cellules T dans le thymus.

À noter que la signalisation par le récepteur Notch1 au cours du développement des cellules T est finement régulée. La signalisation Notch est normalement inhibée dans la moelle osseuse par le facteur de transcription LRF « Leukemia/Lymphoma Related Factor », et l'inactivation conditionnelle de LRF dans les CSHs murines entraîne le développement Notch-dépendant de cellules T de type DP aux dépens des cellules B dans la moelle osseuse (Maeda, Merghoub et al. 2007). Cependant, les niveaux d'expression de *Notch1* augmentent dans les PMPs qui colonisent le thymus (Heinzel, Benz et al. 2007), et continuent d'augmenter du stade PTP jusqu'au stade DN3, où la transcription de *Notch1* est induite par les facteurs de transcription de la famille des protéines E et par Notch1 lui-même (Ikawa, Kawamoto et al.

2006, Dias, Mansson et al. 2008). À partir du stade DN3, bien que la signalisation Notch reste active, les niveaux des transcrits de *Notch1* diminuent et restent bas tout au long des stades suivants du développement des cellules T (Taghon, Yui et al. 2006, Yashiro-Ohtani, He et al. 2009). Ceci est dû à la signalisation pré-TCR qui augmente l'expression d'Id3 « Inhibitor of DNA binding 3 », qui à son tour inhibe l'activité des protéines E (Engel and Murre 2001, Kee 2009). Cette réduction de *Notch1* s'accompagne d'une réduction de ses gènes cibles transcriptionnels après la  $\beta$ -sélection (Taghon, Yui et al. 2006). Les plus importants gènes cibles de Notch au cours du développement des cellules T étant HES-1 « Hairy And Enhancer of Split-1 », Deltex1, CD25, pT $\alpha$  « pre-T cell antigen receptor alpha », et c-Myc « Cellular homolog of the Avian Myelocytomatosis Viral Oncogene v-Myc » (Kopan and Ilagan 2009). Contrairement aux niveaux des transcrits de *Notch1*, les niveaux de surface des protéines de Notch1 sont réduits dans les thymocytes uniquement à partir du stade SPi (Felli, Maroder et al. 1999, Ciofani, Schmitt et al. 2004).

Enfin, en ce qui concerne **l'implication des ligands de Notch dans le développement des cellules T**, la déplétion conditionnelle du ligand *Dll4* dans l'épithélium thymique des souris inhibe la formation des cellules T (Hozumi, Mailhos et al. 2008), alors que la déplétion de *Dll1* n'affecte pas le développement des cellules T mais inhibe par contre le développement des cellules B de la zone marginale de la rate; un événement qui nécessite des interactions entre Dll1 et Notch2 (Hozumi, Negishi et al. 2004). Ceci est en accord avec des données montrant que le ligand Dll4 et non Dll1 est enrichi dans les cTECs, alors que Dll1 est exprimé surtout dans les vaisseaux sanguins du thymus (Hozumi, Mailhos et al. 2008, Koch, Fiorini et al. 2008). D'autre part, les souris déficientes en *Jag1* ou *Jag2* présentent un développement normal des cellules T de type  $\alpha\beta$ , alors que les souris déficientes en *Jag2* possèdent un nombre réduit de cellules T de type  $\gamma\delta$  (Jiang, Lan et al. 1998, Mancini, Mantei et al. 2005). Contrairement aux études *in vivo* qui montrent uniquement un rôle du ligand Dll4 dans le développement des cellules T, les expériences de co-culture *in vitro* montrent que Dll4 et également Dll1 sont capables de trans-activer Notch1 pour induire la différenciation des cellules T à partir des PMPs (Schmitt and Zuniga-Pflucker 2002). Ceci a été testé dans des essais de co-cultures des PMPs avec des lignées stromales OP9 provenant de la moelle osseuse de souris, et dans lesquelles les ligands Dll1 ou Dll4 ont été sur-exprimés. À noter que la

densité des ligands joue un rôle très déterminant dans ces essais. En effet, des niveaux très élevés de Dll1 sont requis pour spécifier les CSHs en cellules T. À des niveaux limitants d'expression des ligands, c'est Dll4 qui est plus efficace que Dll1 à trans-activer Notch1 pour induire la spécification en lignées T et la différenciation des cellules T (Dallas, Varnum-Finney et al. 2005, Mohtashami, Shah et al. 2010). Finalement, l'expression du ligand Dll1 et non celle du ligand Jag1 sur les cellules stromales est capable d'induire la différenciation des CSHs du cordon ombilical humain (CD34<sup>+</sup>) en cellules T (Jaleco, Neves et al. 2001). Parallèlement, des études faites sur les CSHs murines montrent que Dll1 et non Jag1 est capable d'induire la différenciation des CSHs en cellules T de type DP (Visan, Tan et al. 2006), alors que Jag1 a le potentiel d'induire la différenciation uniquement jusqu'au stade DN (Lehar, Dooley et al. 2005).

#### **1.1.4. Rôles en pathologies**

Étant donné que la voie Notch joue un rôle pléiotropique au cours du développement et affecte la formation et l'homéostasie d'un très grand nombre de tissus, il n'est pas très surprenant qu'une dérégulation de cette voie conduise à diverses maladies développementales et au cancer. En effet, l'implication de la voie Notch dans les maladies humaines a été fermement établie à travers de nombreuses évidences (Hansson, Lendahl et al. 2004, Louvi and Artavanis-Tsakonas 2012, Penton, Leonard et al. 2012).

##### **1.1.4.1. Rôles dans diverses maladies développementales**

Les mutations de composants de la voie Notch entraînent des anomalies héréditaires qui affectent divers organes dont le foie, le squelette, les reins, le système cardiovasculaire...

Des mutations du ligand *JAGGED1* et du récepteur *NOTCH2* sont associées au syndrome d'**Alagille**. Ce dernier est une maladie autosomique dominante de nature pléiotropique qui se manifeste dans différents tissus et organes incluant le foie, le squelette, les reins, le cœur, et le visage (Alagille, Odievre et al. 1975, Li, Krantz et al. 1997, Oda, Elkahloun et al. 1997, McDaniell, Warthen et al. 2006, Kamath, Podkamemi et al. 2012).

De même, des mutations de *NOTCH2* ont été corrélées au syndrome de **Hajdu-Cheney**, une maladie dominante entraînant l'ostéoporose, des défauts de la morphologie cranio-faciale, et des kystes rénaux (Heath 2011, Majewski, Schwartzentruber et al. 2011, Simpson, Irving et al. 2011).

D'autre part, des mutations du ligand *Delta-Like3* ainsi que d'autres membres de la voie Notch incluant *Lunatic Fringe* sont associées à la **dysostose spondylo-costale** qui est une maladie autosomique récessive rare due à un défaut de segmentation des vertèbres et des côtes, et caractérisée par de multiples anomalies vertébrales (Bulman, Kusumi et al. 2000, Turnpenny, Whittock et al. 2003, Sparrow, Chapman et al. 2006, Chapman, Sparrow et al. 2011, Sparrow, Faqeih et al. 2013).

Des mutations de la voie Notch sont aussi associées à divers types de maladies cardiovasculaires; incluant les **maladies des valves aortiques** qui impliquent des mutations de *NOTCH1* (Garg, Muth et al. 2005, Mohamed, Aherrahrou et al. 2006), et la **Tétralogie de Fallot**, une cardiopathie congénitale qui implique des mutations de *JAGGED1* (Eldadah, Hamosh et al. 2001, Bauer, Laney et al. 2010). De plus, des mutations de *NOTCH3* sont associées à la maladie vasculaire **CADASIL** « Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy », une maladie dominante qui se manifeste à l'âge adulte, et qui est caractérisée entre autres par des crises de migraine et des accidents vasculaires cérébraux (Joutel, Corpechot et al. 1996, Louvi, Arboleda-Velasquez et al. 2006).

Finalement, il a été suggéré que la voie Notch serait impliquée dans la **sclérose en plaques**, une maladie inflammatoire du système nerveux central résultant de la destruction de la myéline qui est produite par les oligodendrocytes pour protéger les axones neuronaux. Notch jouerait un rôle dans la différenciation des oligodendrocytes et dans la myélinisation (John, Shankar et al. 2002, Bassil, Orent et al. 2013).

#### **1.1.4.2. Rôles dans le cancer**

Il a été démontré que la signalisation Notch joue un rôle crucial, direct ou indirect, dans le développement du cancer. Plusieurs tumeurs solides et leucémies ont été associées à la voie Notch (Mao 2015), et suivant le contexte cellulaire et le type de cancer, Notch peut jouer

le rôle de suppresseur de tumeurs ou d'oncogène (Radtke and Raj 2003, Lobry, Oh et al. 2011). Ceci est relié à la capacité de la signalisation Notch d'induire l'apoptose ou la prolifération des cellules dépendamment du contexte, et de relier ces événements au processus de différenciation des cellules souches par exemple (Bray 2006). De même, cette complexité pourrait résulter des interactions de la voie Notch avec d'autres voies de signalisation dans divers contextes du développement (Hurlbut, Kankel et al. 2007, Louvi and Artavanis-Tsakonas 2012).

Dans les cancers où Notch joue le rôle d'oncogène, le gain de fonction de Notch peut entraîner une dérégulation de la division cellulaire pour favoriser par exemple l'expansion des cellules souches plutôt que leur différenciation, menant au développement des tumeurs (Betschinger and Knoblich 2004, Coumailleau and Gonzalez-Gaitan 2008). En outre, dans le même contexte, Notch pourrait favoriser la prolifération et inhiber l'apoptose conduisant à des tumeurs non reliées aux cellules souches (Emery and Knoblich 2006). Par conséquent, la compréhension des mécanismes de régulation de la signalisation Notch est centrale pour comprendre le développement du cancer et identifier de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles.

Des mutations, ainsi que des dérégulations des niveaux d'expression de divers composants de la voie Notch, incluant les récepteurs et les ligands, ont été associées à différentes tumeurs solides et leucémies. Les principales implications de la signalisation Notch dans le cancer sont résumées dans le tableau II ci-dessous:

Type de Tumeur	Rôle De Notch	Mécanisme
Cancer du pancréas	Oncogène	<ul style="list-style-type: none"> <li>- La sur-expression de JAG2, DLL3, ou DLL4 induit une activation de Notch pour l'initiation et le maintien tumoraux (Mullendore, Koorstra et al. 2009).</li> <li>- La perte de <i>NOTCH2</i> réduit la latence tumorale (Mazur, Einwachter et al. 2010).</li> </ul>

	Suppresseur de tumeurs	La perte de <i>NOTCH1</i> augmente la latence tumorale (Hanlon, Avila et al. 2010).
Cancer du sein	Oncogène	La sur-expression de <i>NOTCH1</i> , 2, 4, <i>JAG1</i> , 2, et <i>DLL4</i> conduit à une sur-activation de Notch et contribue aux événements précoces de progression du cancer du sein (Mittal, Subramanyam et al. 2009).
Cancer du foie	Oncogène	La sur-expression de <i>JAG1</i> induit une activation de Notch et de la prolifération dans les carcinomes hépatocellulaires (Tschaharganeh, Chen et al. 2013).
	Suppresseur de tumeurs	L'activation endogène de Notch inhibe la croissance tumorale et induit l'apoptose (Viatour, Ehmer et al. 2011).
Cancer de la prostate	Oncogène	La sur-expression de <i>NOTCH1</i> et <i>JAG1</i> joue un rôle dans la progression et la métastase tumorales (Zhu, Zhou et al. 2013).
Cancer colorectal	Oncogène	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Une sur-expression de <i>NOTCH1</i> et <i>JAG1</i> dans les cellules néoplastiques des adénocarcinomes du colon (Gao, Liu et al. 2011).</li> <li>- L'inactivation de <i>JAG1</i> inhibe la croissance et l'invasion tumorales (Dai, Wilson et al. 2014).</li> </ul>

Cancer cervical	Oncogène	<p>- La sur-expression de JAG1 et la diminution d'expression de Manic Fringe sont associées au développement du cancer cervical (Veeraraghavalu, Pett et al. 2004).</p> <p>- La réduction de l'expression de <i>NOTCH1</i> et <i>JAG1</i> réduit l'invasion des cellules du carcinome cervical (Pang, Leung et al. 2010).</p>
Cancer gastrique	Oncogène	La sur-expression de NOTCH1, NOTCH2, DLL4 et HES1 est associée à la progression tumorale. Une sur-expression de NOTCH3 et JAG1 est associée aux cancers gastriques de type diffus (Du, Cheng et al. 2014).
Carcinome du poumon non à petites cellules	Oncogène	Des mutations de <i>NOTCH1</i> causent une stabilisation du NICD et sont associées à une réduction de la survie (Westhoff, Colaluca et al. 2009).
Carcinome de la tête et du cou à cellules squameuses	Suppresseur de tumeurs	Des mutations de <i>NOTCH1</i> , 2, et 3 produisent des récepteurs tronqués ou ne liant pas les ligands efficacement, ce qui pourrait perturber la différenciation (Agrawal, Frederick et al. 2011, Stransky, Egloff et al. 2011).
Cancer de la peau	Suppresseur de tumeurs	La perte de <i>NOTCH1</i> dans les kératinocytes favorise la tumorigenèse

		(Nicolas, Wolfer et al. 2003, Lefort and Dotto 2004, Dotto 2008, Demehri, Turkoz et al. 2009).
	Oncogène	Des mutations de <i>FBXW7</i> et une augmentation de l'expression de NOTCH1 favorisent la croissance tumorale dans le mélanome (Aydin, Melamed et al. 2014).
Leucémie aiguë myéloïde	Suppresseur de tumeurs	Une expression de la forme active de NOTCH1, 2, ou HES1 inhibe la croissance tumorale (Kannan, Sutphin et al. 2013).
Leucémie myélomonocytaire chronique	Suppresseur de tumeurs	Des mutations de perte de fonction de <i>NOTCH2</i> , <i>MAML-1</i> , <i>Nicastrin</i> , et <i>APH1</i> sont associées à la maladie (Klinakis, Lobry et al. 2011).
Leucémie lymphoïde chronique	Oncogène	Des mutations de <i>NOTCH1</i> causent une stabilisation du NICD et sont associées à une réduction de la survie (Fabbri, Rasi et al. 2011, Puente, Pinyol et al. 2011).
Leucémie aiguë lymphoblastique des cellules B	Suppresseur de tumeurs	L'activation endogène ou exogène de Notch inhibe la croissance tumorale et induit l'apoptose (Zweidler-McKay, He et al. 2005).
Leucémie aiguë lymphoblastique des cellules T (LAL-T)	Oncogène	Des mutations de <i>NOTCH1</i> ou <i>FBXW7</i> entraînent une activation ligand-indépendante de Notch ou une stabilisation du NICD (Ellisen, Bird et al.

		1991, Weng, Ferrando et al. 2004, Malyukova, Dohda et al. 2007, O'Neil, Grim et al. 2007, Thompson, Buonamici et al. 2007).
--	--	---

**Tableau II :** Tableau récapitulatif des implications de la voie Notch dans les tumeurs solides et leucémies.

Finally, the Notch signaling pathway can also affect the development of cancer by controlling angiogenesis or the formation of new blood vessels; a process crucial for tumor growth and progression. In this context, ligands DLL4 and JAG1 regulate the angiogenesis process competitively. It has been demonstrated that DLL4 acts as a negative regulator of tumor angiogenesis, whereas JAG1 promotes angiogenesis (Bridges, Oon et al. 2011, Liu, Fan et al. 2014).

#### **1.1.4.3. Importance de la voie Notch dans le développement de la leucémie aiguë lymphoblastique des cellules T (LAL-T)**

The acute lymphoblastic leukemia of T cells (LAL-T) constitutes approximately 20% of LAL, and it results from the neoplastic transformation of T cell progenitors in the thymus. The study of this disease has provided the first evidence of an implication of the Notch pathway in cancer, when a translocation t(7;9)(q34;q34.3) was identified in patients with LAL-T (Ellisen, Bird et al. 1991). This translocation causes a fusion of the 3' region of the *NOTCH1* gene with the locus of the *TCR-β* gene, which results in a hyper-expression of the active truncated form of NOTCH1 (NICD). However, this translocation is rare, and it is found in less than 1% of LAL-T. Since then, activating mutations of the *NOTCH1* gene have been detected in more than 55% of LAL-T cases (Weng, Ferrando et al. 2004), placing Notch as a central pathway in this disease (Demarest, Ratti et al. 2008, Ferrando 2009). Two « hot spots

mutationnels » principaux ont été caractérisés dans le gène *NOTCH1* en LAL-T: le domaine HD et le domaine PEST. Des mutations dans les exons 26 ou 27 du domaine HD se retrouvent dans environ 40% des LAL-T humaines et résultent en une hyper-sensibilité à l'activation par les ligands ou en une activation ligand-indépendante de Notch (Malecki, Sanchez-Irizarry et al. 2006). D'autre part, des mutations du domaine PEST se retrouvent dans environ 20-25% des LAL-T, et elles résultent en une augmentation de la stabilité de la forme active de NOTCH1 (NICD) (Thompson, Buonamici et al. 2007). De plus, des mutations inactivatrices de *FBXW7* ont été identifiées dans environ 15% des LAL-T, et elles entraînent également une stabilisation de la forme active de NOTCH1 (NICD), étant donné que *FBXW7* est normalement responsable de l'ubiquitination du NICD et sa dégradation par le protéasome (Malyukova, Dohda et al. 2007, O'Neil, Grim et al. 2007, Thompson, Buonamici et al. 2007). Finalement, environ 15% des LAL-T présentent des mutations mixtes des domaines HD et PEST en cis; dans le même transcrit de *NOTCH1* (Weng, Ferrando et al. 2004), et 5% des LAL-T possèdent à la fois une mutation de *FBXW7*, et du domaine HD de *NOTCH1* (O'Neil, Grim et al. 2007, Thompson, Buonamici et al. 2007).

Les mutations de gain de fonction de *NOTCH1* se retrouvent également dans des modèles animaux de LAL-T (O'Neil, Calvo et al. 2006, Tremblay, Tremblay et al. 2010), où il a été démontré que ces mutations ne sont pas suffisantes à elles seules pour induire la maladie, et que Notch1 est un faible initiateur de tumeurs en LAL-T (Chiang, Xu et al. 2008). Les médiateurs oncogéniques du fonctionnement défectueux de la signalisation Notch en LAL-T sont multiples et comprennent principalement c-Myc (Weng, Millholland et al. 2006), et p53 ou TP53 « Tumor Protein P53 » (Beverly, Felsner et al. 2005).

Le modèle murin double transgénique « *SCL-LMO1* » est l'un des principaux modèles animaux qui ont permis la caractérisation de la fonction des mutations oncogéniques de *NOTCH1* en LAL-T. Les facteurs de transcription SCL/TAL1 « Stem Cell Leukemia/T-cell Acute Lymphocytic Leukemia 1 » et LMO1 « LIM domain Only 1 (rhombotin 1) » sont sur-exprimés dans 50-60% des LAL-T juvéniles, et font l'objet de translocations chromosomiques récurrentes (Begley, Aplan et al. 1989, Boehm, Foroni et al. 1991). SCL est normalement impliqué dans la spécification hématopoïétique à partir des précurseurs du mésoderme (Lecuyer and Hoang 2004). Alors que la sur-expression de SCL seul dans le thymus n'induit

pas la LAL-T, mais uniquement des lymphomes de cellules T avec une faible pénétrance (Condorelli, Facchiano et al. 1996, Curtis, Robb et al. 1997, Goardon, Schuh et al. 2002), celle de LMO1 peut induire la LAL-T avec une longue période de latence de 18 mois (Larson, Fisch et al. 1994). Par contre, la collaboration de SCL et LMO1 accélère l'apparition de la leucémie (3 à 6 mois), et confère une pénétrance totale à la maladie (Aplan, Jones et al. 1997). Bien que suffisante pour l'initiation de la LAL-T, la collaboration *SCL-LMO1* ne suffit pas à elle seule pour la propagation de la maladie. Des événements additionnels, comme l'acquisition de mutations de gain de fonction de *NOTCH1* sont ainsi requis afin de conférer un avantage sélectif pour le maintien des cellules initiatrices de la LAL-T et le développement complet de la maladie dans ce modèle (Tremblay, Tremblay et al. 2010). D'autre part, l'importance de la voie Notch au stade pré-leucémique a été adressée récemment en utilisant ce même modèle « *SCL-LMO1* ». Ainsi, il a été montré que les facteurs de transcription oncogéniques SCL et LMO1 collaborent pour transformer les thymocytes de type DN3 en cellules souches pré-leucémiques ayant la capacité de s'auto-renouveler. L'acquisition de ce potentiel d'auto-renouvellement nécessiterait absolument des niveaux élevés de signal Notch1 et constituerait une première étape critique pour la leucémogénèse (Gerby, Tremblay et al. 2014).

Une fois transformées, les cellules initiatrices de la LAL-T requièrent une signalisation Notch ligand-dépendante de manière continue pour assurer leur maintien et la progression de la maladie. Ceci a été mis en évidence à la fois pour les cellules humaines et dans des modèles animaux de LAL-T (Weng, Ferrando et al. 2004, Armstrong, Brunet de la Grange et al. 2009, Gerby, Clappier et al. 2011, Tatarek, Cullion et al. 2011). Ainsi, il a été démontré par exemple que la co-culture de cellules primaires de LAL-T humaines présentant ou non des mutations de *NOTCH1* avec une lignée stromale de souris exprimant le ligand DLL1 permet le maintien des cellules initiatrices de la LAL-T et la croissance des blastes (Armstrong, Brunet de la Grange et al. 2009). Conformément à cela, des études récentes ont souligné le rôle des ligands de Notch exprimés dans le microenvironnement du stroma dans la croissance et l'invasion des LAL-T Notch-dépendantes (Minuzzo, Agnusdei et al. 2015, Yin, Ye et al. 2015).

#### **1.1.4.4. Avancées thérapeutiques dans le ciblage de la voie Notch en cancer**

Notre connaissance de plus en plus accrue des mécanismes de fonctionnement de la voie canonique de Notch a permis l'exploration de nouvelles avenues pour la modulation thérapeutique de cette voie, notamment en cancer (Andersson and Lendahl 2014). Les principales approches thérapeutiques utilisées présentement incluent l'inhibition de l'interaction ligand-récepteur, et la perturbation du clivage protéolytique du récepteur (Groth and Fortini 2012, Shao, Huang et al. 2012). De plus, l'identification continue de nouveaux régulateurs de la voie Notch fournit des possibilités additionnelles de ciblage moléculaire pour les traitements, et l'interaction de la voie Notch avec d'autres voies de signalisation permet la mise au point potentielle de stratégies thérapeutiques combinées. En gros, différentes approches thérapeutiques ciblant la voie Notch sont en voie de développement; allant des études pré-cliniques précoces dans des cellules en culture, jusqu'aux essais cliniques comme dans le cas des inhibiteurs de la gamma-sécrétase.

**Les inhibiteurs de la gamma-sécrétase (GSIs)** bloquent la signalisation Notch en inhibant la production de la forme active (NICD) à partir des récepteurs Notch transmembranaires. Plusieurs études cliniques sont en cours afin d'optimiser le traitement des cancers Notch-dépendants par l'usage des GSIs (Krop, Demuth et al. 2012, Strosberg, Yeatman et al. 2012, Tolcher, Messersmith et al. 2012, Sahebjam, Bedard et al. 2013, Richter, Bedard et al. 2014). À noter que ces derniers ont été conçus à la base pour diminuer la production des peptides bêta-amyloïdes dans le traitement de la maladie d'Alzheimer, étant donné que la gamma-sécrétase assure aussi le clivage de la protéine précurseur de l'amyloïde (Buxbaum, Liu et al. 1998). En fait, il existe une myriade de voies de signalisation également régulées par la gamma-sécrétase qui possède une multitude de substrats dont CD44 et les cadhérines (Barthet, Georgakopoulos et al. 2012). Pour cela, l'utilisation des GSIs dans le traitement des tumeurs Notch-dépendantes devrait tenir compte de ces effets pléiotropiques de la gamma-sécrétase afin de tenter de réduire la non-spécificité des thérapies. Pour contourner ces problèmes, des efforts considérables sont déployés afin de développer des modulateurs de la gamma-sécrétase permettant d'orienter l'activité de cette enzyme envers des substrats spécifiques (Wolfe 2012). Finalement, un autre problème qui limite l'utilisation des GSIs dans les thérapies est la toxicité gastro-intestinale qui est reliée à la pan-inhibition de la

signalisation Notch (Real and Ferrando 2009), et qui cause une multitude d'effets secondaires sévères comme la diarrhée, la fièvre, les nausées, les vomissements, et la fatigue.

**Des anticorps bloquants qui ciblent des récepteurs NOTCH individuels** tels que NOTCH1 et NOTCH2 ont été développés, et ils fonctionnent bien chez l'humain et chez la souris (Wu, Cain-Hom et al. 2010, Agnusdei, Minuzzo et al. 2014). Cette approche d'inhibition de la signalisation Notch est très prometteuse et elle présente l'avantage d'être plus sélective et de réduire les effets toxiques en comparaison aux GSIs qui causent une inhibition générale de Notch. Ainsi, le ciblage de domaines spécifiques des récepteurs comme le domaine NRR de NOTCH1, NOTCH 2 (Wu, Cain-Hom et al. 2010), ou NOTCH3 (Li, Li et al. 2008) s'est avéré efficace pour bloquer les récepteurs dans une conformation qui ne répond plus aux ligands. Par la suite, des études cliniques de phase I portant sur l'inhibition de récepteurs NOTCH spécifiques, sont en cours afin de tester des anticorps contre NOTCH1, NOTCH2 ou NOTCH3 dans le traitement du cancer (Wang, Li et al. 2010, Yu, Liu et al. 2012)(Tolcher, Chugh et al. 2012 ; Davis, LoRousso et al. 2013).

**Des anticorps bloquants qui ciblent des ligands individuels de Notch** constituent des options thérapeutiques prometteuses, étant donné que les ligands ont des profils d'expression plus restreints que les récepteurs, des fonctions mieux définies, et un taux de mutations bas en cancer (Briot and Iruela-Arispe 2015). Ainsi, des anticorps ciblant le ligand DLL4 ont été développés (Liu, Bham et al. 2011), avec un potentiel thérapeutique en angiogenèse par exemple (Li and Harris 2009). Ces anticorps ont été utilisés pour moduler la vascularisation tumorale dans des modèles animaux (Ridgway, Zhang et al. 2006, Li, Sainson et al. 2007) ou dans des lignées cellulaires transformées (Kuramoto, Goto et al. 2012), et plusieurs d'entre eux font l'objet d'essais cliniques de phase I afin d'évaluer leur toxicité et leur activité anti-tumorale dans le contexte de nombreux types de cancers (Noguera-Troise, Daly et al. 2007, Scehnet, Jiang et al. 2007, Jenkins, Ross et al. 2012). D'autre part, le ligand JAG1 est sur-exprimé dans de nombreux cancers et constitue une cible thérapeutique très intéressante, notamment dans le contexte de l'angiogenèse. Des anticorps contre ce ligand sont en cours de développement et d'étude pour évaluer leur toxicité et leur potentiel anti-tumoral (Li, Masiero et al. 2014). Finalement, l'expression de protéines NOTCH qui servent « d'appâts » pour des ligands spécifiques a été récemment utilisée pour bloquer sélectivement les ligands DLL ou

JAG dans le contexte de l'angiogenèse afin d'inhiber la croissance tumorale. Le développement de telles molécules a été possible grâce à l'identification des domaines EGF-like de NOTCH responsables de son interaction spécifique avec DLL ou JAG (Kangsamaksin, Murtomaki et al. 2015).

**L'inhibition de MAML**, qui interagit avec le complexe NICD-CSL afin de favoriser la transcription des gènes cibles de Notch, constituerait une approche thérapeutique potentielle pour bloquer les effets de la signalisation Notch. En effet, l'expression d'une forme dominante négative de MAML contenant uniquement le domaine N-terminal de la protéine qui se lie à NICD et à CSL, mais qui est incapable de recruter la machinerie de la transcription, inhibe la signalisation Notch en culture cellulaire et dans des modèles de souris transgéniques (Weng, Nam et al. 2003, Osanyingbemi-Obidi, Dobromilskaya et al. 2011). Cependant l'utilisation de cette version dominante négative de MAML pose des problèmes potentiels de spécificité étant donné que MAML pourrait avoir des effets en dehors de la voie Notch, notamment sur le suppresseur de tumeurs p53, et la bêta-caténine (McElhinny, Li et al. 2008, Saint Just Ribeiro and Wallberg 2009). D'autre part, une stratégie alternative plus précise serait d'utiliser un peptide synthétique de MAML ciblant spécifiquement une interface critique du complexe transcriptionnel du NICD. Un tel peptide a démontré des effets anti-prolifératifs en culture cellulaire et dans un modèle murin de LAL-T Notch1-dépendante (Moellering, Cornejo et al. 2009). Cependant, l'efficacité de cette approche devrait être validée dans d'autres systèmes pour évaluer son application thérapeutique potentielle.

## 1.2. Ligands de Notch

Bien que des combinaisons uniques de ligands-récepteurs de Notch ont été identifiées dans le contexte de réponses cellulaires bien définies, les mécanismes moléculaires responsables de ces processus de signalisation ligands-spécifiques demeurent largement inconnus. Ainsi, une question cruciale consiste à savoir si différents complexes ligands-récepteurs de Notch recrutent des effecteurs de signalisation intracellulaires uniques dans la cellule réceptrice et/ou si les ligands possèdent en soi une activité de signalisation finement régulée au niveau de la cellule émettrice du signal (D'Souza, Miyamoto et al. 2008). Tel que

discuté dans la section précédente de l'introduction, les ligands de Notch ont une importance particulière dans les conditions pathologiques Notch-dépendantes, y compris le cancer; et ils constituent des cibles thérapeutiques très prometteuses. De plus, l'usage accru des ligands de Notch pour l'expansion et le maintien des cellules souches dans le contexte des stratégies de régénération des tissus (Delaney, Varnum-Finney et al. 2005, Li, Huang et al. 2008) souligne leur importance biologique fondamentale et la nécessité de comprendre les mécanismes moléculaires contrôlant leur activation.

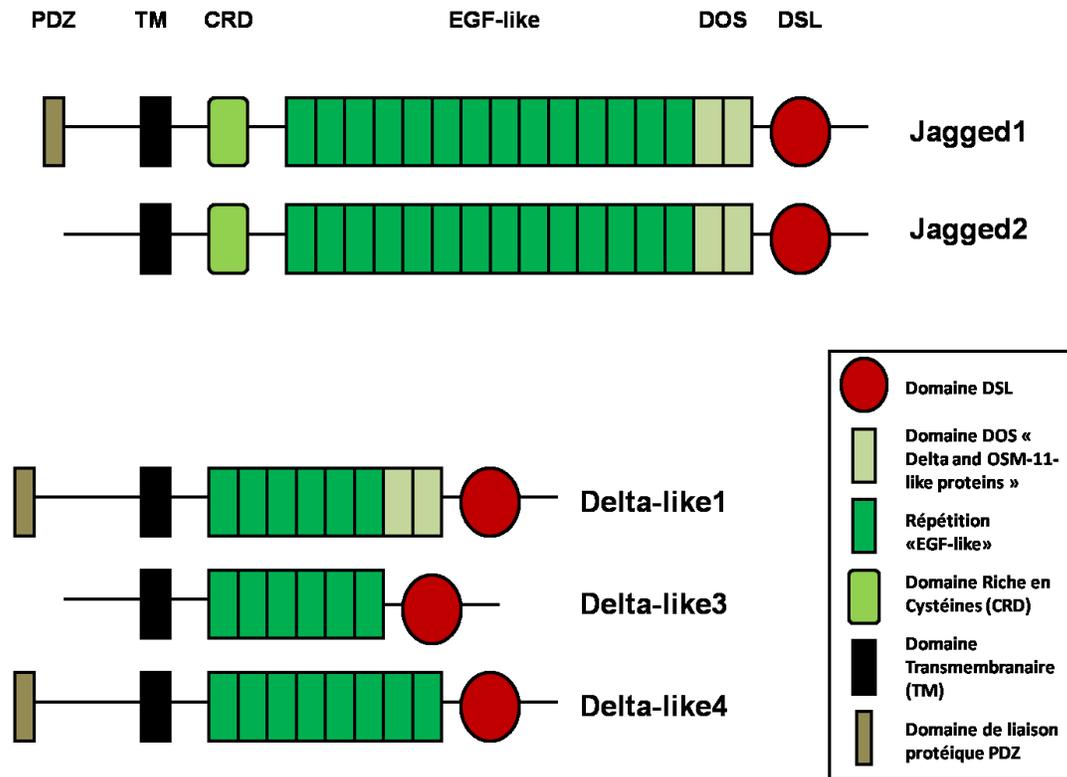
### **1.2.1. Les ligands canoniques à domaine DSL**

Les ligands canoniques à domaine DSL (Delta/Serrate/Lag-2) induisent la majorité des effets de la signalisation Notch. Il s'agit de protéines de surface de type I; ayant un seul domaine transmembranaire (TM). Les ligands DSL sont classés en deux sous-familles: Delta-like et Jagged, d'après leurs homologies respectives aux ligands Delta et Serrate de la *Drosophile* (Kopan and Ilagan 2009). La structure des différents ligands DSL de Notch chez les mammifères est illustrée dans la figure 4 ci-dessous.

Tous les ligands DSL possèdent en commun un domaine extracellulaire contenant une région N-terminale suivie par un domaine DSL et des répétitions « EGF-like », dont certaines ont la capacité de lier le calcium. Le domaine DSL est un domaine « EGF-like » dégénéré qui est nécessaire mais non suffisant pour l'interaction avec le récepteur Notch (Shimizu, Chiba et al. 1999). Des mutations dans des résidus conservés du domaine DSL sont associées à la perte de la signalisation Notch à la fois chez les vertébrés et chez les invertébrés (Henderson, Gao et al. 1994, Tax, Yeagers et al. 1994, Henderson, Gao et al. 1997, Morrissette, Colliton et al. 2001, Parks, Stout et al. 2006). En outre, un motif bien conservé, appelé DOS « Delta and OSM-11-like proteins » a été identifié au sein des deux premiers domaines « EGF-like », et il a été suggéré qu'il collabore avec le DSL pour assurer la liaison au récepteur Notch et l'induction de la signalisation (Shimizu, Chiba et al. 1999, Parks, Stout et al. 2006, Cordle, Johnson et al. 2008, Komatsu, Chao et al. 2008). En particulier, la séquence et l'espacement à l'intérieur du domaine DOS seraient déterminants pour la signalisation. Étonnamment, ce domaine DOS est absent dans les ligands Dll3 et Dll4, ainsi que dans tous les ligands DSL de

*C. elegans*; où il a été suggéré que l'activation optimale de la signalisation Notch nécessiterait une liaison coopérative du récepteur au domaine DOS de ligands non-canoniques (Komatsu, Chao et al. 2008). En plus des domaines DSL et DOS, les séquences situées en position N-terminale du domaine DSL sont bien conservées parmi les ligands canoniques et elles semblent importantes pour la liaison au récepteur et la signalisation (Henderson, Gao et al. 1997, Parks, Stout et al. 2006).

En contrepartie, les domaines intracellulaires des ligands DSL présentent peu d'homologie globale de séquence (Pintar, De Biasio et al. 2007). À l'exception du ligand Dll3, ils comprennent des résidus multiples de lysines qui constituent des sites potentiels d'ubiquitination par des enzymes E3 ubiquitine ligases. À noter que la modification des ligands DSL par ubiquitination est critique pour leur activité de signalisation. De plus, la plupart des ligands DSL possèdent un domaine PDZ « Post synaptic density protein (PSD95), Drosophila disc large tumor suppressor (Dlg), and Zonula occludens-1 protein (ZO-1) » en position C-terminale qui favorise les interactions avec le cytosquelette d'actine, jouant un rôle indépendant de la signalisation Notch (Pintar, De Biasio et al. 2007). Bien que des motifs PDZ ont été prédits pour certains ligands DSL chez les invertébrés (Sheng and Sala 2001), leur importance fonctionnelle demeure peu connue dans ces systèmes.



**Figure 4 :** Représentation schématique de la structure des ligands canoniques de Notch à domaine DSL.

### 1.2.1.1. Les ligands de la famille Delta-like

La structure cristalline du domaine extracellulaire du ligand Dll1 a été récemment résolue. Il s'agit de la première structure d'un ligand de la famille Delta-like, qui comporte le domaine C2 « Calcium-binding motif » en position N-terminale, le domaine DSL, et les six premiers domaines « EGF-like », comprenant le motif DOS, et ayant une conformation très étendue. La comparaison de cette structure à un fragment du ligand Jag1 a permis de déceler des différences entre les 2 familles de ligands DSL au niveau de leurs domaines C2, suggérant des propriétés distinctes de liaisons aux lipides. Cependant, une région hydrophobique conservée à la surface de Dll1 et de Jag1 suggère un site potentiel de liaison au récepteur Notch qui est commun aux deux ligands (Kershaw, Church et al. 2015).

Au sein de la famille Delta-like, les ligands Dll1 et Dll4 présentent plusieurs similitudes au niveau de leurs structures, de leurs fonctions moléculaires, et des mécanismes communs de régulation de leur activité par ubiquitination et endocytose (Shah, Mohtashami et al. 2012). Cependant, ils présentent aussi de nombreuses différences. Par exemple Dll4 possède un motif DSL distinct, et il est exclu de microdomaines membranaires spécifiques: les « radeaux lipidiques », alors que la localisation de Dll1 à ces microdomaines est nécessaire pour sa fonction de signalisation. De même, Dll4 présente des niveaux de surface constitutifs moins élevés que Dll1 dans les lignées stromales en culture, suggérant un potentiel plus élevé que Dll1 à être internalisé par endocytose. Dll4 est aussi capable de s'associer plus fortement à l'enzyme E3 ubiquitine ligase Mib1, et d'interagir plus efficacement avec le récepteur Notch1; ce qui expliquerait sa capacité supérieure à induire le développement des cellules T par rapport à Dll1 (Shah, Mohtashami et al. 2012). Compte tenu de ces différences, les ligands Dll1 et Dll4 possèdent des rôles développementaux distincts qui sont aussi reliés à leurs différents profils d'expression spatio-temporels *in vivo*.

En contrepartie, le ligand Dll3 est le ligand DSL le plus divergent du point de vue structural; étant donné qu'il possède un domaine DSL dégénéré (Dunwoodie, Henrique et al. 1997), et qu'il ne comprend ni de motif DOS (Komatsu, Chao et al. 2008), ni de résidus lysines dans le domaine intracellulaire (Pintar, De Biasio et al. 2007). Dll3 est majoritairement détecté dans le Golgi et il est rarement présent à la surface cellulaire (Geffers, Serth et al. 2007, Chapman, Sparrow et al. 2011). Vu qu'il est incapable de trans-activer les récepteurs Notch, le ligand Dll3 remplit presque exclusivement une fonction de cis-inhibition (Ladi, Nichols et al. 2005), et son activité au sein de la signalisation Notch demeure peu caractérisée. Du point de vue fonctionnel, des études de substitution des gènes chez la souris ont montré que *Dll3* ne peut pas compenser les pertes de fonction de *Dll1*, indiquant que ces deux ligands ne sont pas fonctionnellement équivalents (Geffers, Serth et al. 2007). Les pertes de *Dll3* sont associées à des défauts de segmentation des vertèbres, et à des malformations thoraciques, similaires aux pertes de fonction de la signalisation Notch en somitogenèse (Dunwoodie 2009). En outre, il a été démontré récemment que la modification de Dll3 par O-fucosylation est nécessaire pour sa fonction en somitogenèse (Serth, Schuster-Gossler et al. 2015).

### 1.2.1.2. Les ligands de la famille Jagged

Malgré la similarité dans l'organisation globale des domaines extracellulaires des ligands DSL, il existe quand même certaines différences structurales entre les familles Delta-like et Jagged. Par exemple, les ligands de la famille Jagged ont presque le double du nombre de répétitions « EGF-like » en comparaison aux ligands Delta-like, et certaines de ces répétitions comprennent des insertions conservées à fonction inconnue (Weinmaster 1997). De plus, les ligands de la famille Jagged possèdent un domaine additionnel riche en cystéines (CRD), qui est absent des ligands Delta-like, et qui présente une homologie partielle avec le domaine VWFC « Von Willebrand Factor type C » présent dans diverses protéines (Vitt, Hsu et al. 2001).

De même, la région extracellulaire des ligands Jagged présente certaines particularités, faisant en sorte que des mutations spécifiques au sein de certains domaines de *JAG1* sont critiques et sont associées au syndrome d'Alagille. Celles-ci comprennent des mutations de la séquence N-terminale, du domaine DSL, et de certaines répétitions « EGF-like » en dehors du motif DOS de *JAG1* (Morrisette, Colliton et al. 2001, Warthen, Moore et al. 2006). En outre, des mutations du motif DOS de *JAG1* sont associées à la Tétralogie de Fallot et au syndrome d'Alagille, soulignant l'importance de cette région dans la signalisation Notch (Eldadah, Hamosh et al. 2001, Warthen, Moore et al. 2006, Guarnaccia, Dhir et al. 2009).

### 1.2.2. Les ligands non-canoniques ou atypiques

En plus des ligands canoniques mentionnés ci-dessus, il existe une multitude de ligands non-canoniques ou atypiques qui peuvent induire la signalisation Notch et contribuer ainsi aux effets pléiotropiques de cette voie de signalisation. Ces ligands atypiques ne contiennent pas de domaine DSL, et ils consistent en un groupe de protéines à structures diverses. À noter que les effets de plusieurs ligands non-canoniques de Notch ont été uniquement démontrés en utilisant des essais *in vitro*, nécessitant une validation fonctionnelle *in vivo*. De plus, contrairement aux ligands canoniques à domaine DSL, les ligands non-canoniques ne sont pas essentiels pour le développement embryonnaire et la viabilité chez la souris par exemple. Ceci

suggérerait que la fonction des ligands atypiques *in vivo* se limiterait à une modulation de la signalisation Notch au stade adulte (D'Souza, Meloty-Kapella et al. 2010).

### **1.2.2.1. Les ligands non-canoniques attachés à la membrane**

Le ligand Dlk-1 « Delta-like 1 homolog » est l'un des premiers ligands atypiques de Notch qui ont été signalés (Laborda, Sausville et al. 1993, Smas and Sul 1993), et il est surtout connu pour son rôle dans l'inhibition de l'adipogenèse (Wang, Kim et al. 2006). Dlk-1 présente une structure similaire aux ligands de la famille Delta-like, à l'exception du domaine DSL qui est absent dans Dlk-1. La plupart des études soutiennent que Dlk-1 est incapable de trans-activer Notch et qu'il agit plutôt comme cis-inhibiteur de la signalisation Notch, possiblement par compétition avec les ligands DSL pour la liaison au récepteur (Baladron, Ruiz-Hidalgo et al. 2005, Nueda, Baladron et al. 2007, Bray, Takada et al. 2008). D'autre part, l'identification d'un domaine DOS dans les protéines Dlk-1 et 2 a conduit à la suggestion que ces dernières pourraient fonctionner comme ligands non-canoniques co-activateurs de la voie Notch, en collaboration avec les ligands canoniques qui ne contiennent pas de domaine DOS (Komatsu, Chao et al. 2008).

Le ligand atypique DNER « Delta/Notch-like EGF-related Receptor » est aussi un ligand transmembranaire qui ne contient pas de domaine DSL, mais qui possède des répétitions « EGF-like » dans son domaine extracellulaire (Eiraku, Hirata et al. 2002). Cependant, contrairement à Dlk-1, DNER est capable de trans-activer le récepteur Notch dans des essais de co-culture cellulaire. De plus, des études *in vitro* et *in vivo* démontrent un rôle de DNER dans la morphologie des cellules gliales de Bergmann via l'activation de la signalisation Notch (Eiraku, Tohgo et al. 2005).

Finalement, la protéine Jedi « Jagged and Delta protein » a été identifiée comme ligand « DSL-like » putatif d'après des données d'analyse de séquences (Krivtsov, Rozov et al. 2007). Cependant, des analyses plus poussées de la structure de cette protéine ont montré des divergences avec les domaines DSL et EGF des ligands canoniques de Notch, ainsi qu'avec les domaines EGF des ligands non-canoniques Dlk-1 et DNER (Nanda, Bao et al. 2005, Krivtsov, Rozov et al. 2007). De plus, la protéine Jedi n'a pas été rapportée comme interagissant avec les

récepteurs Notch, ni comme affectant la signalisation Notch, mis à part l'inhibition légère d'un rapporteur de Notch suite à l'ajout d'une forme soluble de Jedi en culture cellulaire. De même, la protéine MEGF10 « Multiple EGF-like domains 10 protein » qui appartient à la même famille de protéines que Jedi (Krivtsov, Rozov et al. 2007) a été démontrée comme affectant la voie Notch (Holterman, Le Grand et al. 2007), et qu'à son tour la signalisation Notch contrôle l'expression de MEGF10 dans les cellules satellites musculaires (Brohl, Vasyutina et al. 2012). Cependant, il n'existe pas d'évidence formelle d'une interaction directe entre MEGF10 et les récepteurs Notch.

#### **1.2.2.2. Les ligands non-canoniques ancrés par GPI**

F3/Contactin1 et NB3/Contactin6 sont des molécules d'adhésion cellulaire neurale ancrées par GPI (glycosylphosphatidylinositol), qui agissent comme ligands non-canoniques activant la signalisation Notch pour induire la différenciation des oligodendrocytes (Hu, Ang et al. 2003, Cui, Hu et al. 2004). Ces protéines ont des structures distinctes de celles des ligands non-canoniques de Notch attachés à la membrane. Bien que les études ont montré que F3 « Neural Cell Surface Protein F3 » et NB3 « Neural Recognition Molecule NB3 » interagissent avec le récepteur Notch en trans, des interactions en cis ne peuvent pas être exclues vu que F3 et NB3 endogènes co-immunoprécipitent avec Notch. Ces deux protéines interagissent avec les répétitions « EGF-like » en aval du domaine de liaison au DSL du récepteur Notch. Cependant, F3 peut aussi interagir avec les domaines « EGF-like » 1 à 13 qui comprennent le domaine de liaison au DSL situé au niveau des EGF 11-12. Ceci suggérerait que F3 peut rentrer en compétition avec les ligands DSL pour la liaison au récepteur. À noter que F3 et NB3 utilisent Deltex plutôt que l'effecteur canonique CSL de la signalisation Notch afin d'induire la différenciation cellulaire (Hu, Ang et al. 2003, Lu, Chen et al. 2008).

#### **1.2.2.3. Les ligands non-canoniques sécrétés**

Chez la *Drosophila*, deux ligands non-canoniques sécrétés ont été identifiés pour Notch; Sca « Scabrous », et Wg « Wingless ». Sca est capable de trans-activer le récepteur

Notch (Powell, Wesley et al. 2001), et il joue un rôle dans les événements Notch-dépendants de formation des ommatidies oculaires et des poils sensoriels (Baker, Mlodzik et al. 1990, Mlodzik, Baker et al. 1990). Quant à Wg, son association au récepteur Notch a été identifiée par criblage d'une banque phagique exprimant des transcrits de l'embryon de *Drosophila*. De plus, la co-immunoprécipitation des protéines Notch et Wg endogènes a confirmé cette interaction *in vivo* dans les embryons de mouches (Wesley 1999). À noter que dans ce contexte, la transcription du gène Shaggy, l'homologue de GSK3 $\beta$  chez la *Drosophila*, peut être activée d'une façon Notch et Wg-dépendante.

Chez *C. elegans*, cinq ligands non-canoniques sécrétés, ayant tous en commun un domaine DOS, ont été identifiés pour Notch; OSM11, OSM7, DOS1, DOS2 et DOS3 (Komatsu, Chao et al. 2008). OSM11 est le mieux caractérisé parmi les cinq ligands, et il interagit avec le domaine extracellulaire de l'homologue du récepteur Notch, LIN-12, dans des essais de double hybride chez la levure. De plus, des analyses génétiques suggèrent qu'OSM-11 peut collaborer avec le ligand canonique DSL-1, et qu'il renforce la signalisation via LIN-12 durant le développement de la vulve, en agissant en amont ou en cours de l'activation du récepteur.

Chez les vertébrés, il existe une multitude de ligands non-canoniques sécrétés qui ont été identifiés pour Notch; incluant CCN3 « Connective Tissue Growth Factor/Cysteine-rich 61/Nephroblastoma Overexpressed Gene family member », MAGP-1 et 2 « Microfibril-Associated Glycoproteins », TSP2 « Thrombospondin2 », YB1 « Y-box protein-1 », et EGFL7 « Epidermal growth factor-like domain 7 ». CCN3 interagit avec le récepteur Notch suite à la co-expression de ces deux protéines. Cette interaction implique le motif à « noeud de cystéines » en position C-terminale de CCN3, et les répétitions « EGF-like » de Notch (Sakamoto, Yamaguchi et al. 2002, Thibout, Martinerie et al. 2003). CCN3 peut agir comme un co-facteur activant la signalisation Notch induite par les ligands canoniques, ou comme activateur de Notch de manière autocrine (Sakamoto, Yamaguchi et al. 2002, Gupta, Hong et al. 2007, Minamizato, Sakamoto et al. 2007). D'autre part, les protéines MAGP-1 et MAGP-2 peuvent interagir avec le récepteur Notch, conduisant à une production gamma-sécrétase-dépendante de NICD, et à une activation des rapporteurs de l'activité de CSL (Miyamoto, Lau et al. 2006). Tout comme CCN3, MAGP-2 peut aussi activer la signalisation Notch de manière autocrine

dans les cellules musculaires lisses vasculaires (Miyamoto, Lau et al. 2006, Albig, Becenti et al. 2008). De même, MAGP-2 peut activer la signalisation Notch en induisant une dissociation de l'hétérodimère du récepteur de façon non-enzymatique, indépendamment des ADAM, par un mécanisme de force de traction semblable à celui des ligands DSL, et qui sera discuté dans la section suivante (Miyamoto, Lau et al. 2006). Par contre, il a été rapporté que MAGP-2 peut paradoxalement inhiber la signalisation Notch dans certains types de cellules (Albig, Becenti et al. 2008). En outre, la protéine de la matrice TSP2 est capable d'interagir avec le récepteur Notch3, et avec le ligand Jagged1; et elle agit comme co-facteur pour accentuer l'activation de la signalisation Notch induite par les ligands DSL (Meng, Zhang et al. 2009). Quant à la protéine de choc froid YB1, elle interagit avec le récepteur Notch3 dans des essais de co-immunoprécipitation et de double hybride chez la levure, et elle est capable d'activer des rapporteurs de l'activité de CSL d'une manière gamma-sécrétase-dépendante (Rauen, Raffetseder et al. 2009). De même, il a été démontré que le ciblage extracellulaire de YB1 induit l'expression de Notch3, l'activation de la signalisation Notch, et la stabilisation de YB1 par un mécanisme potentiel d'autorégulation (Raffetseder, Rauen et al. 2011, Brandt, Raffetseder et al. 2012). Finalement, le ligand non-canonique sécrété EGFL7 a été identifié dans des criblages de double hybride chez la levure comme interagissant avec les quatre récepteurs Notch humains au niveau de leurs domaines de liaison aux ligands DSL, et comme antagonisant la signalisation Notch induite par les ligands de type Jagged (Schmidt, Bicker et al. 2009, Nichol, Shawber et al. 2010). Par contre, EGFL7 est capable d'accentuer la signalisation Notch induite par Dll4, et les essais de double hybride en levure soutiennent qu'EGFL7 peut interagir avec Dll4 et non avec Jag1 ni Jag 2. De même, il a été démontré récemment qu'EGFL7 est capable d'activer la signalisation par Notch1 dans les cellules trophoblastiques afin de favoriser la migration et l'invasion cellulaire (Massimiani, Vecchione et al. 2015).

### 1.2.3. Mécanismes de régulation des ligands canoniques

#### 1.2.3.1. Régulation par ubiquitination

La modification post-traductionnelle des ligands DSL par ubiquitination contribue à la régulation des niveaux de surface des ligands en régulant leur endocytose, et elle est absolument requise pour leur activité de signalisation (Le Borgne and Schweisguth 2003, Nichols, Miyamoto et al. 2007, Weinmaster and Fischer 2011). Tel que mentionné plus haut, les domaines intracellulaires des ligands Delta et Serrate de la *Drosophile*, et des ligands Dll1, Dll4, Jag1, et Jag2 des mammifères, contiennent plusieurs résidus lysines qui constituent des sites potentiels d'ubiquitination par deux enzymes E3 ubiquitine ligase à domaines RING « Really Interesting New Gene », et à structures distinctes; Neur et Mib. L'enzyme Neur a été initialement identifiée par criblage chez la *Drosophile*, et sa fonction a été par la suite amplement caractérisée par des études chez la *Drosophile* et le *Xénope* (Deblandre, Lai et al. 2001, Lai, Deblandre et al. 2001, Pavlopoulos, Pitsouli et al. 2001, Yeh, Dermer et al. 2001, Le Borgne and Schweisguth 2003, Bardin and Schweisguth 2006). De son côté, l'enzyme Mib fut identifiée par des études de criblage chez le poisson zébré (Itoh, Kim et al. 2003, Chen and Casey Corliss 2004); et tout comme pour Neur, il a été démontré que Mib est capable de se lier à Delta et de l'ubiquitiner pour réguler son endocytose et son activité (Koo, Lim et al. 2005).

Le génome de la *Drosophile* code pour un seul gène *Neur* (*dNeur*), et deux gènes *Mib* (*dMib1* et *dMib2*) qui régulent des événements Notch-dépendants distincts, possiblement à travers des profils d'expression distincts de ces E3 ligases *in vivo* (Lai, Roegiers et al. 2005, Le Borgne, Remaud et al. 2005, Pitsouli and Delidakis 2005, Wang and Struhl 2005). De plus, des domaines intracellulaires distincts des ligands régulent leur liaison et leur ubiquitination par Neur et par Mib respectivement, tel que démontré pour Delta (Daskalaki, Shalaby et al. 2011). Donc en gros, les enzymes Neur et Mib sont toutes les deux capables d'ubiquitiner les ligands Delta et Serrate de la *Drosophile* pour stimuler leur endocytose et leur activité de signalisation, et des études génétiques de compensation ont montré que les membres de ces

deux classes distinctes d'E3 ubiquitine ligases sont principalement redondants du point de vue fonctionnel chez la mouche.

Contrairement à leurs fonctions équivalentes chez la *Drosophile*, les gènes *Neur* et *Mib* auraient évolué pour effectuer des rôles distincts dans la signalisation Notch chez les vertébrés. En effet, il a été démontré que *Neur1* et *2* sont dispensables pour le développement normal chez la souris, et que la déficience en *Neur1*, *Neur2*, et *Mib2* ne conduit pas à des phénotypes développementaux reliés à la signalisation Notch, alors que la déficience additionnelle en *Mib1* entraîne des phénotypes de létalité embryonnaire associés à Notch (Koo, Yoon et al. 2007). De même, la perturbation uniquement du gène *Mib1* produit à elle seule des phénotypes de perte de fonction de Notch dans les embryons de souris en développement (Barsi, Rajendra et al. 2005, Koo, Lim et al. 2005). *Mib1*, et non *Mib2*, est fortement exprimé durant le développement embryonnaire (Koo, Yoon et al. 2007), ce qui justifie la nécessité absolue de *Mib1* pour les événements développementaux Notch-dépendants. Alors que les gènes *Mib1* et *Mib2* semblent redondants du point de vue fonctionnel (Zhang, Li et al. 2007), les gènes *Neur1* et *Neur2* ne sont pas capables de sauver le phénotype neurogénique résultant de la perte de fonction de *Mib1* chez le poisson zébré par exemple (Koo, Yoon et al. 2005). De plus, des études cellulaires ont montré que chez les mammifères, *Mib* serait l'enzyme E3 ubiquitine ligase responsable de l'endocytose des ligands DSL et activant la signalisation Notch, alors que *Neur* agirait en aval de *Mib* afin d'orienter la dégradation lysosomale des ligands internalisés, régulant ainsi les niveaux de ligands disponibles pour l'activation de Notch (Song, Koo et al. 2006).

Les fonctionnalités différentes de *Neur* et *Mib* chez les vertébrés pourraient refléter des états d'ubiquitination différents des ligands induits par ces deux classes structurellement distinctes d'enzymes E3 ubiquitine ligases. En effet, les ligands DSL peuvent être mono- et/ou poly-ubiquitinés, et les conséquences fonctionnelles de ces différents types d'ubiquitination sur la signalisation Notch ne sont pas bien caractérisées (Staub and Rotin 2006). De plus, *Neur* et *Mib* pourraient réguler différenciellement l'activité des ligands en modifiant des résidus lysines distincts dans le domaine intracellulaire des ligands, comme illustré pour le ligand Delta chez la *Drosophile* (Daskalaki, Shalaby et al. 2011). Ainsi, il a été démontré que la mutation de deux lysines intracellulaires de Serrate produit des défauts de signalisation Notch associés à un

défaut d'endocytose des ligands et à leur accumulation à la surface cellulaire (Glittenberg, Pitsouli et al. 2006). Par contre, la mutation de la totalité des 17 résidus lysines intracellulaires de Dll1 murin n'entraîne pas de défaut d'internalisation de Dll1, mais conduit plutôt à un défaut de recyclage des ligands associé à un défaut de leur localisation aux « radeaux lipidiques » de la membrane plasmique, et à une réduction de leur efficacité de liaison aux récepteurs Notch, se reflétant par une absence d'activation de la signalisation. D'autre part, un ligand chimérique Dll1-Dll3 qui contient le domaine extracellulaire de Dll1 fusionné aux domaines transmembranaire et intracellulaire de Dll3 est internalisé, et recyclé normalement malgré l'absence des lysines intracellulaires requises pour l'ubiquitination. Cependant, cette chimère présente un défaut de localisation aux « radeaux lipidiques », et est incapable d'activer la signalisation Notch malgré une grande affinité de liaison au récepteur (Heuss, Ndiaye-Lobry et al. 2008). Ceci souligne l'importance de l'ubiquitination des ligands DSL pour leur activité de signalisation, et suggère que l'ubiquitination ne serait pas requise principalement pour l'endocytose constitutive des ligands, mais plutôt pour les événements d'internalisation spécifiques à l'activation de la signalisation. Plus récemment, une analyse mutationnelle fonctionnelle de chacune des lysines intracellulaires de Dll1 a démontré que la lysine 613 constitue le résidu clé pour la trans-activation de Notch. Étonnamment, les ligands mutants pour ce résidu possèdent une capacité normale de trafic et de recyclage, mais présentent un défaut de multi-ubiquitination et d'interaction avec Notch1, et une rétention excessive au niveau des « radeaux lipidiques » (Zhang, Widau et al. 2011). Finalement, des analyses structurales et fonctionnelles ont porté sur les enzymes E3 ubiquitine ligases en soi afin de comprendre leurs mécanismes de régulation des ligands DSL dans la signalisation Notch. Celles-ci comprennent des études de Neur chez la *Drosophila* (He, Saito et al. 2009, Liu, Bonner et al. 2012), et une étude très récente portant sur des analyses cristallographiques, biochimiques, et cellulaires de deux domaines distincts de reconnaissance des ligands au niveau de Mib1 (McMillan, Schnute et al. 2015).

### **1.2.3.2. Régulation par endocytose et/ou recyclage**

Il est bien établi que l'endocytose des ligands DSL dans la cellule émettrice du signal constitue une étape cruciale pour la trans-activation de Notch; et la nature transmembranaire

des ligands serait à la base de ce processus de signalisation (Musse, Meloty-Kapella et al. 2012). Le processus d'endocytose régulant l'activité des ligands DSL consiste en un mode particulier d'internalisation clathrine-dépendante incluant la machinerie d'ubiquitination des ligands, les adaptateurs endocytiques « Epsin-like », la dynamine, la clathrine, l'auxiline, et l'actine (Parks, Klueg et al. 2000, Itoh, Kim et al. 2003, Chen and Casey Corliss 2004, Overstreet, Fitch et al. 2004, Wang and Struhl 2004, Eun, Banks et al. 2008, Banks, Cho et al. 2011, Meloty-Kapella, Shergill et al. 2012).

Bien que l'endocytose des ligands DSL soit absolument requise pour l'activation de la signalisation Notch, le mécanisme exact par lequel l'internalisation des ligands dans la cellule émettrice du signal induit l'activation de Notch dans la cellule réceptrice demeure controversé, et n'est pas encore complètement élucidé. Il existe deux modèles dominants, non-mutuellement exclusifs, de l'activation de Notch par l'endocytose des ligands. Selon le premier modèle, appelé « modèle de recyclage », l'endocytose des ligands survient avant leur interaction avec le récepteur Notch, et elle est nécessaire pour assurer le recyclage des ligands afin de les rendre actifs. Selon le deuxième modèle, appelé « modèle de force de traction », l'endocytose des ligands a lieu après leur interaction avec le récepteur Notch et elle est requise pour générer une force de traction mécanique afin de dissocier le récepteur et activer sa protéolyse. À savoir qu'il existe de nombreuses évidences dans la littérature qui soutiennent l'un ou l'autre des deux modèles, ou qui montrent que ces deux modèles d'endocytose se produisent de façon séquentielle pour activer la signalisation des ligands DSL.

Le « modèle de recyclage » postule que les ligands nouvellement synthétisés et adressés à la membrane plasmique sont incapables de trans-activer le récepteur Notch, et qu'une étape supplémentaire d'internalisation, trafic, et recyclage à la surface cellulaire est requise pour que les ligands acquièrent un potentiel de signalisation. Selon ce modèle, les adaptateurs « Epsin-like » favorisent l'internalisation sélective d'une sous-population de ligands ubiquitinés afin qu'ils soient convertis au cours de leur trafic dans les endosomes de recyclage en molécules de ligands actives (Wang and Struhl 2004, Heuss, Ndiaye-Lobry et al. 2008). À savoir que la nature des modifications conférées aux ligands au cours de ce processus de recyclage afin d'activer leur signalisation demeure inconnue. Ainsi, il a été suggéré que le recyclage pourrait assurer la concentration et le regroupement des ligands, leur localisation à

des microdomaines membranaires comme les « radeaux lipidiques », ou le recrutement de co-facteurs spécifiques pour leur activation (Chitnis 2006, Le Borgne 2006, Nichols, Miyamoto et al. 2007, Heuss, Ndiaye-Lobry et al. 2008). En effet, les « radeaux lipidiques » constituent des microdomaines membranaires riches en cholestérol et en sphingolipides, et ils sont connus pour leur rôle essentiel dans la signalisation cellulaire en permettant la formation de « signalosomes », où les protéines sont concentrées dans des microenvironnements favorables à leur activation. Cependant, les évidences les plus puissantes en faveur du rôle du recyclage des ligands dans l'activation de la signalisation Notch proviennent d'études de la division asymétrique des cellules précurseurs de l'organe sensoriel chez la mouche. Dans ce modèle, la spécification du destin cellulaire est un événement Notch-dépendant qui nécessite l'activation du ligand Delta par recyclage dans une seule des cellules-filles (Emery, Hutterer et al. 2005). Ce recyclage est finement régulé par la petite GTPase Rab11 (Emery, Hutterer et al. 2005) et par le composant du complexe de l'exocyste Sec15 (Jafar-Nejad, Andrews et al. 2005), et il implique une relocalisation de Delta des membranes basolatérales jusqu'aux structures apicales riches en actine (Rajan, Tien et al. 2009, Benhra, Vignaux et al. 2010). Toutefois, ce mécanisme de régulation de l'activité des ligands par recyclage semble spécifique aux tissus polarisés étant donné qu'il n'est pas requis dans d'autres événements développementaux Notch-dépendants (Li, Satoh et al. 2007, Windler and Bilder 2010, Banks, Cho et al. 2011).

Par contre, le « modèle de force de traction » postule que l'endocytose des ligands DSL liés aux récepteurs est requise de manière plus générale pour induire des changements conformationnels au niveau des récepteurs afin de favoriser les clivages activateurs de Notch (Gordon, Arnett et al. 2008); ce processus ne pouvant pas être stimulé par la simple interaction entre les ligands et les récepteurs. Ceci est en accord avec le fait que l'activation protéolytique de Notch implique la trans-endocytose du NECD dans la cellule présentatrice du ligand afin d'induire la signalisation (Klug and Muskavitch 1999, Parks, Klueg et al. 2000, Nichols, Miyamoto et al. 2007, Hansson, Lanner et al. 2010). Ainsi, l'endocytose des ligands serait capable d'exercer une force de traction mécanique sur le récepteur pour dissocier les sous-unités de l'hétérodimère Notch et pour exposer le site de clivage par ADAM qui est normalement masqué par la NRR du récepteur en l'absence de ligand (Musse, Meloty-Kapella et al. 2012). Des études de microscopie à force atomique confirment ce modèle en montrant

que Delta a une grande affinité de liaison à Notch (Ahimou, Mok et al. 2004), justifiant ainsi la résistance des interactions ligands-récepteurs à l'importante force d'endocytose requise pour les changements conformationnels et la dissociation du récepteur. Plus récemment, des analyses biophysiques ont fourni l'évidence claire que les cellules présentatrices des ligands génèrent des forces mécaniques suite aux interactions avec le récepteur Notch, et que ces forces sont requises pour l'activation de la signalisation. Ces études portent sur l'usage des pinces optiques pour mesurer la force de rupture de cellules exprimant le ligand Dll1 et liées à des billes Notch1 piégées au laser. Ces essais ont ainsi exclu un rôle de l'endocytose et du recyclage dans la modulation de la liaison des ligands au récepteur Notch1, et ont révélé une machinerie d'endocytose mise en place suite à l'interaction avec le récepteur afin d'exercer la force de traction requise pour l'activation de la signalisation (Meloty-Kapella, Shergill et al. 2012, Shergill, Meloty-Kapella et al. 2012).

### **1.2.3.3. Régulation par protéolyse**

En plus des processus d'endocytose et de recyclage, l'activité des ligands DSL peut être régulée par protéolyse. En effet, tel que décrit pour le récepteur Notch, les ligands DSL font l'objet de clivages successifs par les enzymes ADAM et gamma-sécrétase, conduisant à l'isolation du domaine extracellulaire des ligands et à la libération de leur domaine intracellulaire dans le cytoplasme (Six, Ndiaye et al. 2003). Cependant, contrairement à l'effet positif de la protéolyse du récepteur sur l'activation de la signalisation Notch, la protéolyse des ligands pourrait inhiber ou renforcer la signalisation. En outre, alors que l'activation protéolytique du récepteur est strictement régulée par la liaison aux ligands, le mécanisme d'induction et de régulation de la protéolyse des ligands n'est pas bien caractérisé.

Il a été rapporté que les ligands DSL des mammifères peuvent être clivés par plusieurs enzymes de la famille ADAM incluant ADAM9, ADAM10, ADAM12, et ADAM17 (Dyczynska, Sun et al. 2007), alors que les ligands DSL de la *Drosophile* sont clivés uniquement par les homologues d'ADAM10 et d'ADAM17 (Zolkiewska 2008). Ce clivage par ADAM entraîne la libération du domaine extracellulaire du ligand qui contient les sites de liaison au récepteur Notch, ce qui conduit à une réduction des interactions en trans et en cis

entre les fragments de ligands transmembranaires et les récepteurs. Ceci va se refléter en effets opposés sur la signalisation Notch. Ainsi, la perte des interactions en trans conduit à une réduction de la signalisation, alors que la perte des interactions en cis réprimerait la cis-inhibition conduisant ainsi à une augmentation de la signalisation Notch (Dyczynska, Sun et al. 2007, Jin, Choi et al. 2007, Sun, Li et al. 2008). D'autre part, plusieurs études se sont intéressées à l'activité de signalisation des domaines extracellulaires libérés suite au clivage des ligands par ADAM. La plupart de ces études montrent un effet négatif de ces fragments extracellulaires solubles sur la signalisation Notch, alors que d'autres suggèrent que ces fragments de ligands peuvent inhiber ou activer la signalisation Notch dépendamment du contexte cellulaire. Toutefois, il a été signalé que l'expression ectopique des domaines extracellulaires de Delta ou de Serrate chez la *Drosophila* antagonise la signalisation Notch (Sun and Artavanis-Tsakonas 1997). Conformément à cela, des formes recombinantes solubles contenant les portions extracellulaires des ligands sont incapables d'activer la signalisation Notch *in vitro*, à moins qu'elles soient pré-immobilisées. La pré-fixation des ligands étant probablement requise pour pouvoir induire une force de traction suffisante sur les récepteurs afin d'activer leur protéolyse. Ainsi, bien que les formes solubles des ligands peuvent interagir avec les récepteurs Notch, elles sont incapables de les activer; et elles agissent comme antagonistes de la signalisation Notch induite par les ligands transmembranaires exprimés en trans, probablement par compétition avec ces derniers à la liaison aux récepteurs (Varnum-Finney, Wu et al. 2000, Hicks, Ladi et al. 2002, Shimizu, Chiba et al. 2002, Vas, Szilagyi et al. 2004, Lobov, Renard et al. 2007).

Le rôle physiologique de la protéolyse des ligands DSL par les enzymes ADAM est peu caractérisé. Cependant, il y a des études qui ont signalé une réduction de la signalisation Notch *in vivo* suite au clivage de Dll1 par des métalloprotéases. Ainsi, il a été rapporté que la protéine de surface RECK « Reversion-inducing Cysteine-rich protein with Kazal motifs » liée au GPI, est capable d'inhiber spécifiquement l'activité d'ADAM10, et d'activer la signalisation Notch dans le système nerveux central en réprimant le clivage protéolytique de Dll1 (Muraguchi, Takegami et al. 2007, Park, Lee et al. 2013). De même, il a été démontré que le clivage de Dll1 par l'enzyme MT1-MMP « Membrane Type 1-Matrix Metalloproteinase 1 »

dans les cellules stromales de la moelle osseuse est nécessaire pour réduire la signalisation Notch afin d'assurer la différenciation des cellules B (Jin, Zhang et al. 2011).

Finalement, les fragments transmembranaires des ligands DSL issus de la protéolyse par les enzymes ADAM vont à leur tour être clivés par l'enzyme gamma-sécrétase, conduisant à la libération cytoplasmique des domaines intracellulaires des ligands. Vu que ces derniers ont été détectés dans le noyau de la cellule émettrice, et qu'ils produisent en soi des phénotypes lorsqu'ils sont sur-exprimés dans les cellules en culture, il a été suggéré qu'ils peuvent avoir des fonctions de signalisation dans les cellules exprimant les ligands (LaVoie and Selkoe 2003, Kolev, Kacer et al. 2005, Hiratochi, Nagase et al. 2007). Cependant la sur-expression de différentes formes du domaine intracellulaire de Dll1 murin *in vivo* n'affecte pas le développement embryonnaire, ce qui contredit un rôle des fragments intracellulaires dans la signalisation (Redeker, Schuster-Gossler et al. 2013).

#### **1.2.3.4. Régulation par phosphorylation**

Contrairement aux récepteurs Notch, la modification post-traductionnelle des ligands DSL et la régulation de leur activité de signalisation par le processus de phosphorylation sont très peu explorées. Récemment, une étude a rapporté l'identification par spectrométrie de masse de trois sites de phosphorylation, incluant deux résidus sérine et un résidu thréonine dans le domaine intracellulaire de Dll1 murin. Les trois événements de phosphorylation nécessiteraient l'association de Dll1 à la membrane plasmique et impliqueraient une phosphorylation séquentielle des deux résidus sérine. Ainsi la phosphorylation d'un résidu sérine probablement par la protéine kinase B (PKB) amorce la phosphorylation de l'autre sérine. La mutation des trois sites de phosphorylation *in vitro* entraîne une augmentation de la demi-vie de Dll1 accompagnée cependant d'une réduction de ses niveaux de surface, d'une augmentation de sa protéolyse, et par conséquent d'une réduction significative de son activité de signalisation. Par contre, la mutation des trois sites de phosphorylation *in vivo* n'affecte pas la fonction de Dll1 au cours des processus de somitogenèse, myogenèse, neurogenèse, et développement des cellules B de la zone marginale, suggérant que des mécanismes

compensatoires sont mis en place *in vivo* pour rétablir les niveaux de signalisation physiologiques de Dll1 (Braune, Schuster-Gossler et al. 2014).

#### **1.2.3.5. Régulation par glycosylation**

Tout comme les récepteurs Notch, les ligands DSL peuvent faire l'objet de modifications par glycosylation au niveau de séquences conservées au sein de leur répétitions « EGF-like » (Panin, Shao et al. 2002). Cependant, à date, aucun effet de ces modifications n'a été détecté sur l'activité de signalisation des ligands chez les invertébrés ni chez les vertébrés. Ainsi, le ligand Delta de la *Drosophila* reste fonctionnel en l'absence d'O-fucosylation (Okajima and Irvine 2002), et il en est de même pour le ligand Dll1 murin (Muller, Rana et al. 2014).

#### **1.2.3.6. Régulation par liaison aux glycosphingolipides**

L'importance des lipides membranaires dans la modulation de l'activité de signalisation des ligands DSL de Notch a été adressée initialement dans une étude chez la *Drosophila* montrant une corrélation entre le contenu en glycosphingolipides (GSLs) de la membrane plasmique et l'endocytose Mib-dépendante de Delta pour activer Notch. Ainsi, un motif de liaison aux GSLs a été identifié dans la région N-terminale de Delta et de Serrate, et il a été suggéré que ce motif module l'association des ligands à la membrane, et par la suite leur processus d'endocytose (Hamel, Fantini et al. 2010). Plus récemment, une analyse structurale a démontré que la région N-terminale des ligands JAG1 et DLL1 humains contient un domaine C2 de liaison calcium-dépendante aux phospholipides, et que la mutagenèse dirigée du domaine C2 de *JAG1* entraîne une réduction de l'activation de Notch (Chillakuri, Sheppard et al. 2013). De plus, il a été démontré que le motif de liaison aux GSLs initialement identifié dans les ligands DSL de Notch en *Drosophila* est également conservé chez les mammifères, et qu'il est nécessaire à l'activité de signalisation du ligand Dll1. Des mutations dans ce motif résultent en un défaut de trafic et de recyclage de Dll1, et en une inactivation rapide de Dll1 par protéolyse et dégradation (Heuss, Tarantino et al. 2013).

### **1.2.3.7. Régulation par liaison à des protéines à domaines PDZ**

Chez les vertébrés, les ligands Dll1, Dll4, et Jag1 possèdent des domaines PDZ en position C-terminale qui peuvent engager des interactions avec d'autres protéines contenant aussi des domaines PDZ. Ces séquences de liaison aux domaines PDZ sont dispensables à la fois pour l'activation des ligands DSL, et pour l'inhibition de la signalisation Notch (Glittenberg, Pitsouli et al. 2006). Par contre, elles sont requises pour moduler les effets des ligands sur plusieurs processus comme l'adhésion et la migration cellulaires via la liaison à l'actine, et la transformation oncogénique par régulation de la transcription (Ascano, Beverly et al. 2003, Six, Ndiaye et al. 2004, Wright, Leslie et al. 2004, Mizuhara, Nakatani et al. 2005). Bien que les interactions PDZ ne régulent pas l'activation de la signalisation Notch, il a été rapporté que la perte du motif PDZ de Delta renforce son activité de signalisation (Estrach, Legg et al. 2007). Ceci soulève la possibilité que les interactions via le domaine PDZ pourraient par exemple empêcher l'accès des ligands à des voies d'endocytose spécifiques requises pour leur activation.

À noter qu'il existe certaines différences de séquences au niveau des domaines PDZ des ligands DSL (Pintar, De Biasio et al. 2007), qui sont probablement à l'origine de leurs préférences de liaison à des protéines à domaines PDZ spécifiques. Ainsi, Jag1 par exemple n'est pas capable de se lier aux protéines à domaines PDZ MAGI-1 « Membrane-Associated Guanylate kinase with Inverted domain arrangement-1 », et Dlg1 « human homolog of *Drosophila* discs large 1 ». Mais ces dernières interagissent par contre avec Dll1 et Dll4 (Six, Ndiaye et al. 2004, Mizuhara, Nakatani et al. 2005). De même, la protéine de liaison à synaptojanin-2 interagit avec le motif PDZ de Dll1 et de Dll4, et non avec celui de Jag1, afin de stabiliser les ligands et de favoriser la signalisation Notch dans les cellules endothéliales (Adam, Berger et al. 2013).

### 1.2.3.8. Régulation de l'expression des ligands

La signalisation Notch peut réguler négativement ou positivement l'expression des ligands DSL. Ainsi, des défauts de la signalisation Notch sont associés à une augmentation de l'expression des ligands Dll1 et Dll4 (de la Pompa, Wakeham et al. 1997, Suchting, Freitas et al. 2007), alors que des signaux Notch inductifs augmentent l'expression des ligands DSL pour assurer la formation de la marge de l'aile chez la *Drosophila* (Doherty, Feger et al. 1996) et la somitogenèse chez les vertébrés (Barrantes, Elia et al. 1999, Takahashi, Inoue et al. 2003). De plus, il a été démontré récemment que la signalisation par Dll4/Notch1 induit l'expression de Jag1 dans les cellules endothéliales, qui à son tour antagonise les effets de Dll4 et favorise la maturation vasculaire (Pedrosa, Trindade et al. 2015).

D'autre part, plusieurs voies de signalisation interagissent avec la voie Notch pour réguler l'expression des ligands DSL et induire des réponses cellulaires spécifiques (Hurlbut, Kankel et al. 2007). La plupart de ces voies de signalisation augmentent l'expression des ligands de Notch. Par exemple, la voie canonique de Wnt active la transcription de Dll1 durant la somitogenèse (Hofmann, Schuster-Gossler et al. 2004). De même, VEGF « Vascular Endothelial Growth Factor » induit l'expression de Dll4, alors que TNF  $\alpha$  « Tumor Necrosis Factor alpha » induit celle de Jag1 dans la vascularisation angiogénique (Roca and Adams 2007, Sainson and Harris 2008, Benedito, Roca et al. 2009). De plus, au niveau du système immunitaire, des réponses inflammatoires spécifiques augmentent l'expression soit de Dll1 ou de Jag1 dans les cellules dendritiques afin d'affecter l'activation des cellules T auxiliaires (Maekawa, Tsukumo et al. 2003, Amsen, Blander et al. 2004). Par contre, PDGF « Platelet Derived Growth Factor » et angiotensine II réduisent l'expression de Jag1 pour limiter la croissance des cellules musculaires lisses vasculaires *in vitro* (Campos, Wang et al. 2002). En outre, FGF « Fibroblast Growth Factor » réduit l'expression de Dll1 et augmente celle du récepteur Notch dans les précurseurs neuro-épithéliaux pour inhiber la différenciation neuronale (Faux, Turnley et al. 2001), et les lipopolysaccharides réduisent l'expression de Jag1 dans les cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse pour inhiber la prolifération des cellules T CD4<sup>+</sup> (Liotta, Angeli et al. 2008). Finalement, dans le contexte pathologique, l'expression élevée de Jag1 constitue un lien entre les voies de signalisation Wnt et IL-6 d'une part, et l'activation de Notch d'autre part, dans les cancers du sein et du colon (Sansone, Storci

et al. 2007, Studebaker, Storci et al. 2008, Pannequin, Bonnans et al. 2009, Rodilla, Villanueva et al. 2009).

### **1.3. Problématique de recherche et objectifs du projet de thèse**

Il n'existe aucun doute que les études multiples qui ont porté sur la voie de signalisation Notch au fil des années nous ont fourni un aperçu sans précédent des mécanismes de régulation de cette voie dans les contextes physio-pathologiques. Cependant, la plupart de ces recherches se sont intéressées principalement à la compréhension des processus de signalisation dans la cellule réceptrice du signal. Par la suite, les mécanismes de régulation des ligands DSL de Notch dans la cellule émettrice du signal ne sont pas amplement caractérisés. De plus, malgré l'identification d'un nombre de molécules et de processus agissant sur les ligands tels que décrits ci-haut, plusieurs questions demeurent sans réponse quant à l'effet de ces régulateurs sur la modulation du signal Notch dans les différents événements de signalisation. Pour cela, une meilleure compréhension de la régulation des ligands de Notch est impérativement nécessaire, en particulier parce que les ligands possèdent une grande importance fonctionnelle dans les contextes physiologiques et pathologiques Notch-dépendants.

En effet, les ligands DSL de Notch jouent un rôle clé *in vivo* dans divers événements physiologiques importants. Par exemple, l'activation de Notch dans le système immunitaire (Radtke, MacDonald et al. 2013) est initiée par les ligands; en particulier durant le développement des cellules B de la zone marginale dans la rate, et le développement des cellules T dans le thymus (Hozumi, Negishi et al. 2004, Hozumi, Mailhos et al. 2008). De plus, il a été démontré que l'activité des ligands doit être finement régulée au cours de ces processus. Ainsi, l'endocytose des ligands est requise pour le développement des cellules T (Shah and Zuniga-Pflucker 2012), et la protéolyse des ligands a des effets variés sur le développement des cellules T ainsi que celui des cellules B (Manilay, Anderson et al. 2005, Li, Boyd et al. 2007, Gravano and Manilay 2010, Gravano, McLelland et al. 2010, Jin, Zhang et al. 2011).

Parallèlement, il a été démontré que l'activation de Notch dans des événements pathologiques comme le cancer peut être modulée par la régulation des ligands DSL. En effet, dans les cancers où Notch agit comme oncogène, la transformation des cellules survient souvent suite à des mutations qui activent le récepteur *NOTCH* de façon constitutive, l'hypermobilisent à l'activation par le ligand, ou stabilisent sa forme active (NICD) (Lobry, Oh et al. 2011). Dans ces deux derniers cas, NOTCH demeure activé par ses ligands. Conformément à ce point de vue, des études fonctionnelles montrent que plusieurs cancers induits par des mutations oncogéniques de *NOTCH1* demeurent ligands-dépendants, ou que l'activation des ligands agit de façon synergique pour accentuer ces mutations oncogéniques. C'est le cas de certains cancers cérébraux, cervicaux, cancers du sein, et la LAL-T dans une certaine mesure (Weng and Aster 2004, Lobry, Oh et al. 2011). Tel que décrit plus haut, la LAL-T est parmi les cancers Notch-dépendants les mieux caractérisés du point de vue moléculaire; avec des mutations oncogéniques de *NOTCH1* identifiées dans plus de 55% des LAL-T humaines (Weng, Ferrando et al. 2004). De plus, l'auto-renouvellement des cellules souches leucémiques, et par conséquent la propagation de la LAL-T dans des modèles murins, répondent aux traitements par des inhibiteurs de la gamma-sécrétase (GSIs) (Ferrando 2009). Vu que les GSIs empêchent la protéolyse du récepteur Notch suite à son interaction avec son ligand, ceci suggère que le ciblage de l'activation ligand-dépendante de Notch en cancer constitue une approche thérapeutique très puissante. Tel que mentionné précédemment, les GSIs engendrent des effets secondaires de toxicité (Ferrando 2009), ce qui met en évidence la nécessité de trouver des stratégies de traitements alternatives. Par la suite, une meilleure compréhension des mécanismes de régulation des ligands pourrait fournir de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles pour les cancers Notch-dépendants dont la LAL-T.

Ainsi, nous sommes actuellement confrontés à de sérieux défis afin d'explorer les mécanismes moléculaires sous-jacents à la régulation du signal de Notch dans la cellule émettrice. Ces mécanismes devraient nous fournir des indications importantes sur les régulateurs des ligands DSL qui sont pertinents pour les événements de signalisation physiologiques et pathologiques liés à Notch.

Pour cela, nous nous sommes intéressés au laboratoire à identifier de nouveaux régulateurs des ligands DSL, spécifiquement dans la cellule émettrice du signal. À la lumière des données disponibles dans la littérature, nous avons émis les hypothèses suivantes:

- La force du signal Notch pourrait être modulée aussi bien dans des contextes physiologiques que dans des contextes pathologiques en modulant l'activité des ligands DSL.

- Les ligands DSL pourraient être régulés de façon complexe, à différents niveaux afin de générer des molécules actives capables de trans-activer le récepteur Notch. Cette régulation impliquerait différents mécanismes moléculaires présentement inconnus ou peu explorés, et qui affecteraient différents processus tels que : les niveaux d'expression, le repliement, les modifications post-traductionnelles, le trafic, la localisation subcellulaire, et la stabilité et protéolyse des ligands.

Afin de vérifier ces hypothèses, nous avons choisi une approche de biologie des systèmes permettant d'avoir une vision globale du réseau complexe des gènes régulant les ligands DSL de Notch, et nous nous sommes concentrés spécifiquement sur les ligands de la famille Delta-like, surtout Delta-like1. Ainsi, les objectifs spécifiques de mon projet de thèse sont:

- L'identification de nouveaux régulateurs des ligands Delta-like utilisant une approche de criblage haut-débit basée sur la suppression des gènes par shARN dans la cellule émettrice du signal.

- La validation des régulateurs nouvellement identifiés dans des contextes physio-pathologiques Notch-dépendants.

- La caractérisation moléculaire préliminaire de nouveaux régulateurs des ligands.

## **Chapitre 2**

## 2. Matériel et méthodes

### 2.1. Plasmides et constructions d'ADN

La construction contenant le rapporteur CSL optimisé de Notch: pGL3-PJH26 (8xCBF1) a été fournie par M. Hancock et A. Orth (Miyamoto, Lau et al. 2006). La séquence de « 8xCBF1 » a été excisée du plasmide pGL3 et sous-clonée dans le vecteur pcDNA3.1\_F-LUC « Firefly Luciferase », provenant du laboratoire de Dr. Daniel Lamarre (IRIC), et codant pour un gène de résistance à l'hygromycine permettant la sélection de lignées stables.

La construction contenant la séquence codante complète du gène *Tmem128* de souris (GenBank: BC110310) provient du plasmide commercial pCMV-SPORT6 (Open biosystems-clone 5325405).

Toutes les constructions ont été séquencées avant utilisation.

### 2.2. Culture cellulaire

#### 2.2.1. Lignées cellulaires

Les lignées cellulaires OP9 possédant les gènes *Dll1* et *GFP* (OP9-DL1), *Dll4* et *GFP* (OP9-DL4), ou *GFP* seul comme contrôle (OP9-CTL) ont été obtenues du Dr. Juan Carlos Zúñiga-Pflücker (Université de Toronto). Il s'agit de cellules stromales dérivées de la moelle osseuse de souris et transduites par infection rétrovirale pour exprimer de façon stable *Dll1*, ou *Dll4*, ou le vecteur vide, en même temps que la *GFP* à partir d'un transcrite bicistronique sous le contrôle du promoteur MSCV-LTR « Murine Stem Cell Virus- Long Terminal Repeat » (Schmitt, de Pooter et al. 2004, Mohtashami, Shah et al. 2010). Les cellules OP9 ont été maintenues dans du milieu MEM-alpha supplémenté avec 20% de sérum bovin fœtal (FBS) et 1% de pénicilline/streptomycine (100 unités/mL) (Invitrogen). Pour la génération de lignées

stables de cellules OP9-DL1 exprimant les shARNs contre des gènes spécifiques, les cellules OP9-DL1 ont été transduites avec le shARN lentiviral contre le gène d'intérêt, et ensuite sélectionnées avec 10 µg/mL de puromycine (Bioshop).

Les cellules HeLa humaines, qui expriment de façon endogène le récepteur transmembranaire NOTCH1, ont été fournies par le Dr Paul Maddox (IRIC). Ces cellules ont été transfectées avec le vecteur pcDNA3.1\_8xCBF1\_F-LUC en utilisant l'agent de transfection TransIT-LT1 (Mirus Bio LLC), et sélectionnées avec 200 µg/mL Hygromycine B (Invitrogen) à des dilutions limites pour générer des clones HeLa exprimant de manière stable le rapporteur de Notch: 8xCBF1-F-LUC. Un seul clone HeLa a été choisi pour les études ultérieures. Cette lignée clonale de cellules HeLa stables a été par la suite maintenue dans du milieu DMEM supplémenté avec 10% de FBS, 1% de pénicilline/streptomycine (100 unités/mL), et 200 µg/mL d'hygromycine B (Invitrogen). Toutes les cellules ont été maintenues dans une atmosphère humidifiée (37°C, 5% CO<sub>2</sub>).

### **2.2.2. Cellules primaires**

Les progéniteurs de cellules T (ou thymocytes) de type DN3 ont été isolés de souris WT ou de souris pré-leucémiques doubles transgéniques (*SCL-LMO1*) âgées de 5 semaines par une procédure en deux étapes; incluant l'enrichissement en thymocytes DN par sélection négative, suivi par le tri des thymocytes DN3 par cytométrie en flux. En effet, les thymocytes DN ont été enrichis par déplétion des thymocytes DP et SP exprimant les marqueurs CD4 et/ou CD8, ainsi que des globules rouges résiduels exprimant le marqueur Ter119. Cette sélection négative a été effectuée en utilisant les anticorps de rats anti-souris suivants : anti-CD8a purifié, (53-6.7) dilution 1/800 ; anti-CD4 purifié (L3T1) 1/800 ; anti-TER119 purifié (fait maison) 1/20. Ces anticorps primaires ont été détectés par des anticorps secondaires de chèvres anti-rats couplés à des billes magnétiques « BioMag » (1 ml /50 x 10<sup>6</sup> cellules, Qiagen). Les cellules exprimant les marqueurs reconnus par ces anticorps ont été ensuite exclues par passage sur aimant à deux reprises. Les thymocytes DN ainsi enrichis ont été par la suite marqués pour le tri afin d'isoler la sous-population DN3 (CD44<sup>-</sup> ; CD25<sup>+</sup>). Tous les anticorps utilisés pour le tri proviennent de Pharmingen (BD Biosciences, Mississauga,

Ontario, Canada): Anti-CD44 (IM7), anti-CD25 (PC61.5), anti-CD4 (RM4-4), anti-CD8 (53-6.7), et Thy1.2 (30-H12). Le marquage non spécifique a été bloqué par pré-incubation avec de l'immunoglobuline humaine (25 µg/mL dans du milieu IMDM contenant 10% FCS « Fœtal Calf Serum »). Les cellules mortes ont été exclues par marquage à l'iodure de propidium. La purification des sous-populations de thymocytes DN3 a été réalisée à l'aide du trieur BD FACSAria (BD Biosciences). Le degré de pureté des DN post-déplétion étant de 98% tel que vérifié par cytométrie en flux. Les DN3 constituent 53% des thymocytes DN.

Les thymocytes DN3 ainsi purifiés ont été co-cultivés avec les cellules stromales OP9-CTL ou OP9-DL1 dans du milieu MEM-alpha (Invitrogen) supplémenté avec 10% de FBS (Invitrogen), 10 mM d'HEPES « 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid » (Invitrogen), 1 mM de pyruvate de sodium (Invitrogen), 55 µM de 2-mercaptoéthanol (Invitrogen), 2 mM de Glutamax (Invitrogen), 1% de pénicilline/streptomycine (100 unités/mL) (Invitrogen), 5 ng/mL de ligand de FLT-3 « FMS-like tyrosine kinase 3 » (308-FK, R&D system), et 5 ng/mL d'interleukine IL-7 (407-ML, R&D system).

## **2.3. Crible primaire basé sur l'essai luciférase avec les cellules**

### **OP9-DL1**

4 000 cellules OP9-DL1 ont étéensemencées dans 100 µL par puits de milieu MEM-alpha supplémenté avec 20% de FBS, 1% de pénicilline/streptomycine (100 unités/mL) et 4 µg/mL de polybrène « hexadiméthrine bromide » (Sigma), dans des plaques blanches à 96 puits à fond plat (BD Falcon). Les cellules OP9-DL1 ont été ensuite transduites avec les shARNs lentiviraux de la collection « MISSION TRC » (Sigma-Aldrich) à une multiplicité d'infection (MOI) de 10 (Volume approximatif: 10 µL de lentivirus). Trois jours plus tard, 16 000 cellules HeLa exprimant de façon stable le plasmide rapporteur de Notch (8xCBF1-F-LUC) ont été rajoutées aux monocouches de cellules confluentes OP9-DL1 dans 75 µL par puits de milieu DMEM supplémenté avec 10% de FBS et 1% de pénicilline/streptomycine (100 unités/mL). Un jour plus tard, le volume total de milieux dans les puits (185 µL/puits) a été enlevé et remplacé par 100 µL de mélange contenant le tampon de lyse et le substrat luciférine pour effectuer la lecture luciférase. (Recette du mélange pour une plaque de 96 puits

complète: 7.4 mL d'eau distillée, 2 mL de tampon de lyse 5X (contenant 10% de Brij 58 (Sigma)), 100 µL d'ATP 100X à 0.2 g/mL (Sigma), 450 µL de luciférine à 1 mg/mL (Nanolight technology) et 70 µL de 2-mercapto-éthanol (Bioshop)). Les signaux de luminescence ont été mesurés 10 min après la lyse cellulaire en utilisant le lecteur de plaques « EnVisionMultilabel » (Perkin Elmer). OP9-CTL et OP9-DL1 sh*Mib1* ont été utilisés comme contrôles positifs, alors qu'OP9-DL1 et OP9-DL1 shNT « non-cible » ont été utilisés comme contrôles négatifs.

## **2.4. Crible secondaire basé sur l'essai luciférase avec les cellules**

### **OP9-DL4**

4 000 cellules OP9-DL4 ont étéensemencées dans 100 µL par puits de milieu MEM-alpha supplémenté avec 20% de FBS, 1% de pénicilline/streptomycine (100 unités/mL) et 8 µg/mL de polybrène « hexadiméthrine bromide » (Sigma), dans des plaques blanches à 96 puits à fond plat (BD Falcon). Afin d'obtenir la même efficacité d'infection qu'avec les cellules OP9-DL1, les cellules OP9-DL4 ont été transduites avec les shARNs lentiviraux de la collection « MISSION TRC » (Sigma-Aldrich) à une multiplicité d'infection (MOI) de 20; soit le double de la MOI utilisée pour OP9-DL1 (Volume approximatif: 20 µL de lentivirus). Trois jours plus tard, 16 000 cellules HeLa exprimant de façon stable le plasmide rapporteur de Notch (8xCBF1-F-LUC) ont été rajoutées aux monocouches de cellules confluentes OP9-DL4 dans 75 µL par puits de milieu DMEM supplémenté avec 10% de FBS et 1% de pénicilline/streptomycine (100 unités/mL). Un jour plus tard, le volume total de milieux dans les puits (195 µL/puits) a été enlevé et remplacé par 100 µL de mélange contenant le tampon de lyse et le substrat luciférine pour effectuer la lecture luciférase. Les signaux de luminescence ont été mesurés 10 min après la lyse cellulaire en utilisant le lecteur de plaques « EnVisionMultilabel » (Perkin Elmer). OP9-CTL et OP9-DL4 sh*Mib1* ont été utilisés comme contrôles positifs, alors qu'OP9-DL4 et OP9-DL4 shNT ont été utilisés comme contrôles négatifs.

## **2.5. Crible secondaire fonctionnel basé sur la différenciation des DN3 WT**

1 000 cellules OP9-DL1 ont été ensemencées par puits de plaques à 384 puits (BD Falcon) en présence de 4 µg/mL de polybrène « hexadimethrine bromide » (Sigma). Les cellules OP9-DL1 ont été ensuite transduites avec les shARNs lentiviraux de la collection « MISSION TRC » (Sigma-Aldrich) à une multiplicité d'infection (MOI) de 10. Trois jours plus tard, 5 000 thymocytes DN3 WT ont été rajoutés aux monocouches de cellules confluentes OP9-DL1 (pour la composition du milieu de co-culture, voir conditions de culture des cellules primaires ci-haut). Quatre jours plus tard, le nombre absolu de cellules DP générées par différenciation des DN3 a été évalué dans chaque puits par cytométrie en flux, utilisant le module haut-débit. OP9-CTL et OP9-DL1 sh*Mib1* ont été utilisés comme contrôles positifs, alors qu'OP9-DL1 et OP9-DL1 shNT ont été utilisés comme contrôles négatifs.

La préparation des suspensions monocellulaires à partir des thymus de souris WT (voir section 2.2.2.) et le marquage des thymocytes pour la cytométrie en flux ont été effectués tel que décrit précédemment (Herblot, Steff et al. 2000). Tous les anticorps utilisés pour l'analyse par cytométrie en flux proviennent de Pharmingen (BD Bioscience): CD44 (IM7), CD25 (PC61.5), CD4 (RM4-4), CD8 (53-6.7) et Thy1.2 (30-H12). Les cellules mortes ont été exclues par marquage à l'iodure de propidium. Le tri cellulaire a été réalisé sur le cytomètre FACS-Aria (BD Biosciences), alors que les analyses de cytométrie en flux ont été effectuées sur le cytomètre LSRII (BD Biosciences) utilisant le logiciel DIVA (BD Biosciences).

## **2.6. Crible secondaire fonctionnel basé sur la survie des DN3 pré-leucémiques**

1 000 cellules OP9-DL1 ont été ensemencées par puits de plaques à 384 puits (BD Falcon) en présence de 4 µg/mL de polybrène « hexadimethrine bromide » (Sigma). Les cellules OP9-DL1 ont été ensuite transduites avec les shARNs lentiviraux de la collection « MISSION TRC » (Sigma-Aldrich) à une multiplicité d'infection (MOI) de 10. Trois jours plus

tard, 5 000 thymocytes DN3 pré-leucémiques ont été rajoutés aux monocouches de cellules confluentes OP9-DL1 (pour la composition du milieu de co-culture, voir conditions de culture des cellules primaires ci-haut). Quatre jours plus tard, le nombre absolu de cellules DN3 viables a été évalué dans chaque puits par cytométrie en flux, utilisant le module haut-débit. OP9-CTL et OP9-DL1 sh*Mib1* ont été utilisés comme contrôles positifs, alors qu'OP9-DL1 et OP9-DL1 shNT ont été utilisés comme contrôles négatifs.

La préparation des suspensions monocellulaires à partir des thymus de souris pré-leucémiques (*SCL-LMO1*), le marquage des thymocytes pour la cytométrie en flux, le tri cellulaire, ainsi que les analyses ont été effectués de la même façon que pour le crible secondaire de différenciation des DN3 WT (voir méthode ci-dessus).

## 2.7. Souris

Tous les animaux ont été maintenus dans un environnement exempt d'agents pathogènes, d'après les directives institutionnelles d'entretien des animaux et les instructions du Conseil Canadien de protection des animaux. Les souris transgéniques utilisées: (*SCL*<sup>tg</sup>) et (*LMO1*<sup>tg</sup>) ont été préalablement décrites (McGuire, Rintoul et al. 1992, Aplan, Jones et al. 1997). Ces souris transgéniques ont été maintenues dans le background C57BL6 et générées par des croisements.

## 2.8. Essai de transplantation

Les thymocytes DN3 pré-leucémiques provenant de souris donneuses doubles transgéniques *SCL-LMO1* (CD45.2<sup>+</sup>) ont été purifiés par tri cellulaire et co-cultivés dans des plaques à 24 puits (à raison de 100 000 cellules par puits) avec les cellules OP9-CTL, OP9-DL1, ou les lignées shARNs stables: OP9-DL1 sh*Mib1*, OP9-DL1 sh*Tmem128*, et OP9-DL1 shNT. Au bout de 4 jours de co-culture, les thymocytes résultants ont été transplantés par voie intraveineuse dans des souris receveuses (CD45.1<sup>+</sup>) irradiées à une dose sous-létale (600 cGy). Le chimérisme thymique dans la population de cellules T (Thy1.2<sup>+</sup>) a été analysé par

cytométrie en flux et représenté par le pourcentage de thymocytes de souris donneuses (% CD45.2<sup>+</sup>) dans le thymus de souris receveuses 7 semaines après la transplantation. 8 souris receveuses ont été évaluées par condition. L'analyse statistique des résultats a été réalisée en utilisant le logiciel « GraphPad Prism 4.03 ».

## 2.9. Analyse des niveaux d'expression des ARNm par PCR quantitative (qPCR)

L'ARN total a été extrait des cellules OP9-DL1 utilisant le « RNeasy mini kit » (Qiagen), suivant les instructions de la compagnie. L'absence de dégradation des échantillons d'ARN a été validée par migration sur gel « Agilent Bioanalyzer 2100 ». L'ADNc a été synthétisé à partir de l'ARN total utilisant le « High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit » (Applied Biosystems). Les réactions qPCR ont été effectuées avec les essais TaqMan d'expression des gènes, utilisant « TaqMan Fast qPCR Master Mix » (Applied Biosystems) et « ViiA™ 7 Real-Time PCR System » (Applied Biosystems). Toutes les données ont été normalisées par rapport aux niveaux d'expression des deux gènes: *Hprt* « Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase » et *Actb* « Actin, beta ». Les différentes amorces utilisées sont décrites dans le tableau ci-dessous:

Gène	Amorce sens	Amorce anti-sens
<i>Mib1</i>	ttgttgattttggttgcac	atggagaggggtgcacctt
<i>Tmem128</i>	cccatcacaactgcaacttc	agcagcaagggagtgaaaa
<i>Dll1</i>	gacaccaagtgccagtcaca	tctggccttttctgtcagg
<i>Cdc37</i>	ggccatgaaggaatatgaagag	aaagcacttctgcagctcct
<i>Hprt</i>	tcctcctcagaccgctttt	cctggttcacatcgctaata

<i>Actb</i>	aaggccaaccgtgaaaagat	gtggtacgaccagaggcatac
-------------	----------------------	-----------------------

**Tableau III :** Liste des amorces utilisées pour les gènes de souris dans les expériences de qPCR.

## 2.10. Analyse des niveaux d'expression des protéines par immunobuvardage de type western

Après un lavage au PBS « Phosphate Buffered Saline » froid, les cellules OP9-CTL ou OP9-DL1 ont été lysées dans du tampon froid contenant: PBS 1X (Bioshop), 1% de détergent SDS (Dodécylsulfate de sodium) (Bioshop), et 1mM d'EDTA (Éthylène Diamine Tétra-Acétique) (Bioshop), en présence du cocktail d'inhibiteurs de protéases 1X « cOmplete Protease Inhibitor Cocktail (Roche) ». Les lysats cellulaires obtenus ont été incubés sur glace dans des tubes eppendorfs pendant 20 min avant d'être centrifugés à 4°C pendant 10 min à 13 000 rpm (tours par minutes). Les surnageants contenant les extraits totaux de protéines ont ensuite été collectés pour être analysés par immunobuvardage de type western. Ainsi, les extraits protéiques ont été séparés sur un gel SDS-PAGE « Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis » contenant 10% d'acrylamide, transférés sur une membrane de nitrocellulose, et détectés par chimioluminescence à l'aide d'anticorps spécifiques. Les anticorps primaires utilisés sont les suivants: Anti-Actine monoclonal de souris (MAB1501R, Dilution 1/10 000, Chemicon) pour détecter la protéine Actine comme contrôle; et Anti-T7 monoclonal de lapin (D9E1X, Dilution 1/1 000, #13246 Cell Signaling) pour détecter la protéine Delta-like1 qui est sur-exprimée de façon exogène dans la lignée OP9-DL1, et qui possède un « tag » T7 en C-terminal. Ainsi l'anticorps Anti-T7 reconnaît le fragment entier, ainsi que le fragment transmembranaire de DLL1 issu du clivage par ADAM. Les anticorps secondaires suivants, conjugués à l'enzyme HRP « Horseradish Peroxidase », ont été utilisés: HRP-Anti-souris (W4021); et HRP-Anti-lapin (W4011) (Dilution 1/5 000, Promega).

## 2.11. Marquage, montage, et imagerie par immunofluorescence des cellules

Les cellules OP9-CTL ou OP9-DL1 ont été cultivées, avec ou sans cellules HeLa, sur des lamelles rondes de 8 mm de diamètre, dans des plaques à 24 puits (BD Falcon) pendant 1 à 5 jours. Les cellules ont ensuite été marquées pour l'immunofluorescence dans les puits-mêmes, utilisant le protocole suivant:

- **Fixation** : Après un lavage au PBS, les cellules ont été fixées pendant 20 min à température pièce dans 200  $\mu$ L d'une solution contenant 5% PFA (paraformaldéhyde) dans PBS 1X (Bioshop).

- **Lavage**: Après fixation, les cellules ont été rincées 3 fois au PBS 1X pour enlever toute trace de PFA.

- **Perméabilisation**: Les membranes des cellules ont ensuite été perméabilisées pendant 5 min à température pièce dans 200  $\mu$ L d'une solution contenant 0.3% Triton X-100 dans PBS 1X (Bioshop).

- **Bloc**: Les cellules ont été incubées pendant 1 heure, à température pièce, avec 200  $\mu$ L de la solution de bloc contenant 5% BSA « Bovine Serum Albumin » (Sigma) dans PBS 1X, et ceci afin de saturer les sites de liaisons non spécifiques.

- **Marquage avec les anticorps primaires**: Les dilutions recommandées d'anticorps primaires ont été préparées dans une solution contenant 2% BSA (Sigma) dans PBS 1X. Les cellules ont ensuite été incubées pendant 1 heure, à température pièce, avec 200  $\mu$ L de la dilution d'anticorps primaires.

- **Lavage**: Pour enlever toute trace d'anticorps primaires non spécifiquement liés, les cellules ont été rincées 3 fois au PBS 1X.

- **Marquage avec les anticorps secondaires et le DAPI (4'-6-Diamidino-2-phénylindole)**: Les dilutions recommandées d'anticorps secondaires et de DAPI (pour marquer les noyaux) ont été préparées dans une solution contenant 2% BSA (Sigma) dans PBS 1X. Les cellules ont ensuite été incubées avec 200  $\mu$ L de la dilution préparée pendant 1 heure, à température pièce, à l'abri de la lumière.

- **Lavage**: Pour enlever toute trace d'anticorps secondaires non spécifiquement liés, les cellules ont été rincées 3 fois au PBS 1X.

- **Montage:** Finalement, les lamelles de cellules ont été montées sur des lames de microscope (VWR), dans 1 goutte de vectashield par lamelle, et elles ont été scellées avec du vernis à ongles.

Les anticorps primaires utilisés sont les suivants: Anti-NOTCH1 polyclonal de lapin pour détecter le domaine intracellulaire du récepteur NOTCH1 (Dilution 1/100, sc-6014-R, Santa Cruz Biotechnology); Anti-T7 monoclonal de lapin (D9E1X, Dilution 1/200, #13246 Cell Signaling) pour détecter le domaine intracellulaire du ligand Delta-like1; Anti-KDEL monoclonal de souris pour marquer le réticulum endoplasmique (RE), vu qu'il reconnaît la séquence KDEL (lysine, acide aspartique, acide glutamique, leucine) de rétention au RE (10C3, Dilution 1/500, Novus); et Anti-TMEM128 polyclonal de chèvre pour détecter le domaine N-terminal de TMEM128 (Dilution 1/50, sc-248873, Santa Cruz Biotechnology).

Les anticorps secondaires utilisés sont les suivants: Alexa Fluor 555 anti-souris (A-21422); Alexa Fluor 635 anti-souris (A-31574); Alexa Fluor 546 anti-chèvre (A-21085); Alexa Fluor 647 anti-chèvre (A-21446); Alexa Fluor 555 anti-lapin (A-21430); Alexa Fluor 635 anti-lapin (A-31576) (Dilution 1/1 000, Molecular Probes, Invitrogen).

Les images des cellules ont été acquises à l'aide du microscope confocal inversé LSM 700 (Zeiss), utilisant soit l'objectif 40x à l'huile, ou l'objectif 63x à l'huile. Le principe de la microscopie confocale est basé sur le fait que seulement une partie de la lumière réfléchie passe à travers un « pinhole » permettant l'observation à haute résolution de sections optiques très fines des cellules. Par la suite une reconstruction 3D peut être effectuée par superposition de ces sections. Les images acquises au microscope confocal à fluorescence ont été ensuite analysées avec le programme LSM, puis traitées à l'aide d'Adobe Photoshop. Les quantifications des niveaux de fluorescence ont été effectuées sur le programme Image J.

## **2.12. Visualisation de microdomaines membranaires: les « radeaux lipidiques » par immunofluorescence**

Nous avons utilisé le « Vybrant Alexa Fluor 594 Lipid Raft Labeling Kit » (V-34405, Molecular Probes, Invitrogen) afin de marquer des microdomaines membranaires spécifiques:

les « radeaux lipidiques » pour l'immunofluorescence, suivant les instructions de la compagnie. Ainsi, les cellules OP9-DL1 vivantes ont été incubées, dans les plaques de culture cellulaire, pendant 10 min à 4°C avec la sous-unité B de la toxine du choléra (CT-B) conjuguée au fluorophore rouge (Alexa Fluor 594). La CT-B reconnaît le ganglioside GM1 « monosialotetrahexosyl ganglioside » qui est distribué sélectivement dans les « radeaux lipidiques » de la membrane plasmique. Après le marquage avec la CT-B, les cellules ont été lavées 3 fois au PBS froid avant d'être incubées pendant 15 min à 4°C avec un anticorps anti-CT-B qui reconnaît spécifiquement la CT-B liée aux « radeaux lipidiques », et qui va permettre la réticulation des « radeaux lipidiques » pour former des patches distincts à la membrane plasmique que nous pouvons visualiser par microscopie à fluorescence. Après cette étape, les cellules ainsi marquées ont encore été rincées 3 fois au PBS froid pour éliminer les anticorps non spécifiquement liés.

Par la suite, ces cellules ont été fixées et nous avons effectué un marquage de DLL1 en conditions non- perméabilisantes utilisant l'anticorps primaire monoclonal Anti-DLL1 qui reconnaît le domaine extracellulaire du ligand Delta-like1 (Dilution 1/50, #128314, BioLegend), et l'anticorps secondaire Alexa Fluor 635 anti-souris (Dilution 1/1 000, A-31574, Molecular Probes, Invitrogen).

Les images des cellules ont été acquises à l'aide du microscope confocal à fluorescence LSM 700 (Zeiss), utilisant l'objectif 63x à l'huile. Les images ont été ensuite analysées avec le programme LSM, puis traitées à l'aide d'Adobe Photoshop.

### **2.13. Marquage et analyse des niveaux de surface des ligands par cytométrie en flux**

Les cellules OP9-CTL ou OP9-DL1 ont été détachées des puits de culture à l'aide d'une solution de PBS 1X contenant 10 mM d'EDTA, afin de générer des suspensions monocellulaires. Le marquage des suspensions de cellules vivantes pour la cytométrie en flux a été effectué d'après le protocole suivant:

- **Lavage:** Les cellules ont été lavées avec du PBS froid et centrifugées pendant 5 min à 1 200 rpm.

- **Marquage:** Les culots cellulaires ainsi rincés ont été resuspendus dans une solution de PBS 1X contenant 2% FBS et une dilution 1/400 de l'anticorps Anti- DLL1 de souris (#128314, BioLegend) conjugué à l'APC (Allophycocyanine) afin de marquer le ligand DLL1 à la surface des cellules. Les cellules ont été incubées avec cette solution d'anticorps pendant 15 min à 4°C à l'abri de la lumière.

- **Lavage:** Les cellules ont été lavées 2 fois avec du PBS froid et centrifugées pendant 5 min à 1 200 rpm.

Finalement les culots cellulaires ont été resuspendus dans une solution de PBS 1X contenant 2% FBS (500 µL de solution/échantillon). Les cellules ont été ensuite analysées par cytométrie en flux utilisant l'instrument LSRII (BD Biosciences) et le logiciel DIVA (BD Biosciences).

## **2.14. Essai d'adhésion des thymocytes DN sur le stroma de cellules OP9**

L'essai d'adhésion des thymocytes DN sur le stroma de cellules OP9 a été réalisé tel que décrit précédemment (Murata, Okuyama et al. 2010). 20 000 cellules OP9-CTL ou OP9-DL1 ont été cultivées à 37°C pendant 2 jours, dans des plaques à 48 puits. Après deux jours de culture, les monocouches confluentes de cellules OP9 ont été lavées au PBS, et 150 000 thymocytes DN isolés de souris WT et suspendus dans 200 µL de milieu MEM-Alpha supplémenté en cytokines (pour la composition du milieu de co-culture, voir conditions de culture des cellules primaires ci-haut: section 2.2.2.) ont été rajoutés à chaque puits. Les DN ont été ainsi incubés avec les cellules OP9 à 37°C pour les durées indiquées. Après chaque durée, les thymocytes DN non-adhérents ont été récupérés par agitation vigoureuse des plaques de culture pendant 30 secondes sur un agitateur de plaques. Les DN non-adhérents ont ensuite été déposés sur un hémacytomètre pour être comptés. Pour chaque laps de temps, le

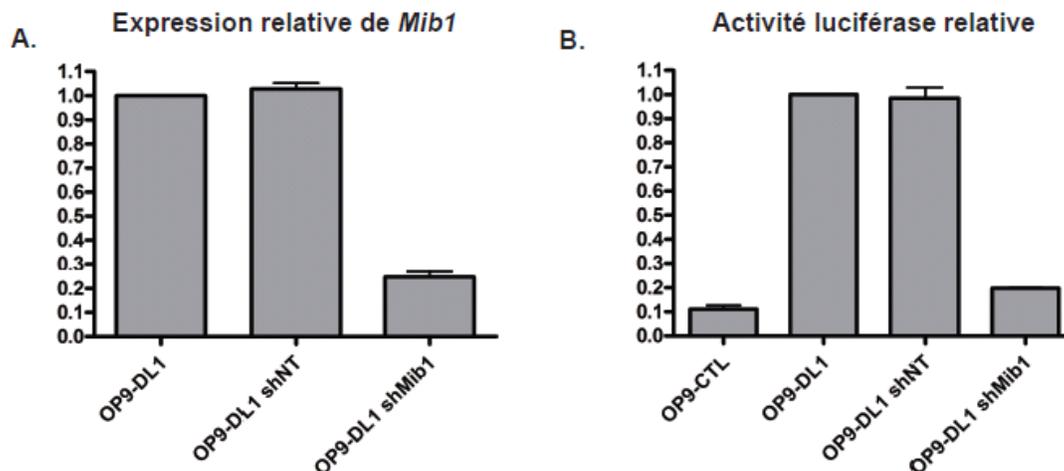
pourcentage de DN non-adhérents a été calculé relativement aux thymocytes initialement rajoutés aux puits (150 000/puits). 3 réplicats ont été analysés par condition par laps de temps.

## Chapitre 3

### **3. Identification de nouveaux régulateurs des ligands Delta-like1 et 4 et validation dans des événements physiopathologiques Notch-dépendants**

#### **3.1. Mise au point d'un essai robuste pour identifier de nouveaux régulateurs du ligand Delta-like1 par criblage pan-génomique**

Afin d'identifier de nouveaux gènes impliqués dans le processus d'activation des ligands de Notch de la famille Delta-like, nous avons mis au point les conditions optimales pour un criblage par ARNi basé sur un système de co-culture *in vitro*. Nous avons commencé par tester plusieurs lignées cellulaires dans le contexte de cet essai de trans-activation de Notch. Par la suite, nous avons sélectionné les cellules OP9-DL1 comme cellules émettrices du signal. Ces dernières sont des cellules stromales de la moelle osseuse de souris, qui expriment le ligand Delta-like1 (*Dll1*) et la *GFP* de façon stable, à partir d'un même transcrit bicistronique, et qui sont extrêmement efficaces pour induire la trans-activation de Notch (Schmitt, de Pooter et al. 2004). D'autre part, nous avons sélectionné les cellules HeLa comme cellules réceptrices. Ces dernières expriment le récepteur NOTCH1 de façon endogène, et nous les avons transfectées de manière stable avec un plasmide codant pour un rapporteur luciférase de l'activité transcriptionnelle de Notch (8xCBF1-F-LUC). Trois jours précédant l'ajout des cellules HeLa, nous avons infecté les cellules OP9-DL1 avec des lentivirus codant pour des shARNs afin de réduire efficacement l'expression des gènes dans cette lignée émettrice (Figure 5A). Par la suite, les cellules HeLa furent rajoutées, et l'activité de Notch dans ces cellules réceptrices fut évaluée 24 heures après co-culture à l'aide du rapporteur luciférase. En utilisant un shARN très puissant contre le régulateur connu des ligands *Mib1* comme contrôle positif; et un shARN non-cible (shNT) comme contrôle négatif, nous avons réussi à mettre au point l'essai pour le crible primaire. Ainsi, nous avons établi les conditions idéales pour évaluer une plage dynamique d'activation de Notch via l'utilisation du rapporteur luciférase (Figure 5B).



**Figure 5 :** Mise au point du crible primaire à essai luciférase.

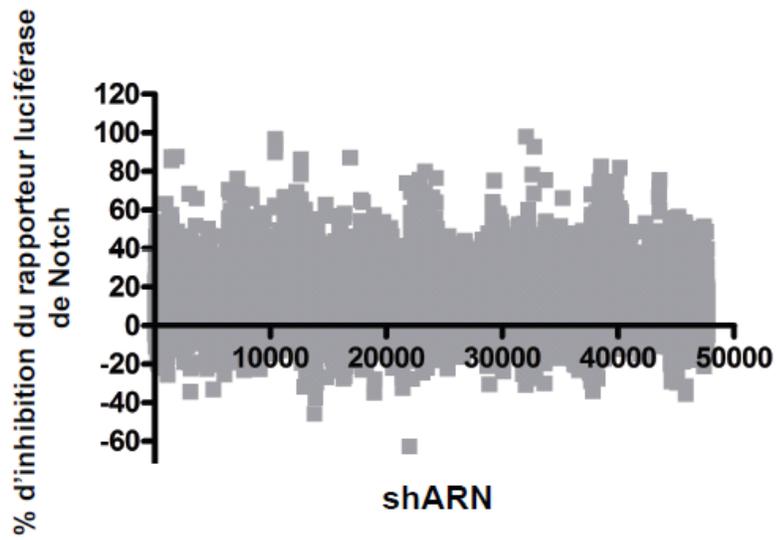
A. qPCR montrant que les niveaux d'expression de *Mib1* sont efficacement réduits par shARN dans les cellules OP9-DL1. B. Essai luciférase de trans-activation de Notch montrant que l'activité luciférase relative dans les cellules HeLa est efficacement réduite par co-culture avec des cellules OP9-CTL n'exprimant pas le ligand DLL1 ou avec des cellules OP9-DL1 transduites avec le shARN contre *Mib1* en comparaison aux cellules OP9-DL1 non-transduites. Les données proviennent d'au moins 3 expériences distinctes. Les valeurs représentent la moyenne et l'erreur standard de la moyenne (SEM).

### 3.2. Résultats du crible primaire et des cribles de confirmation

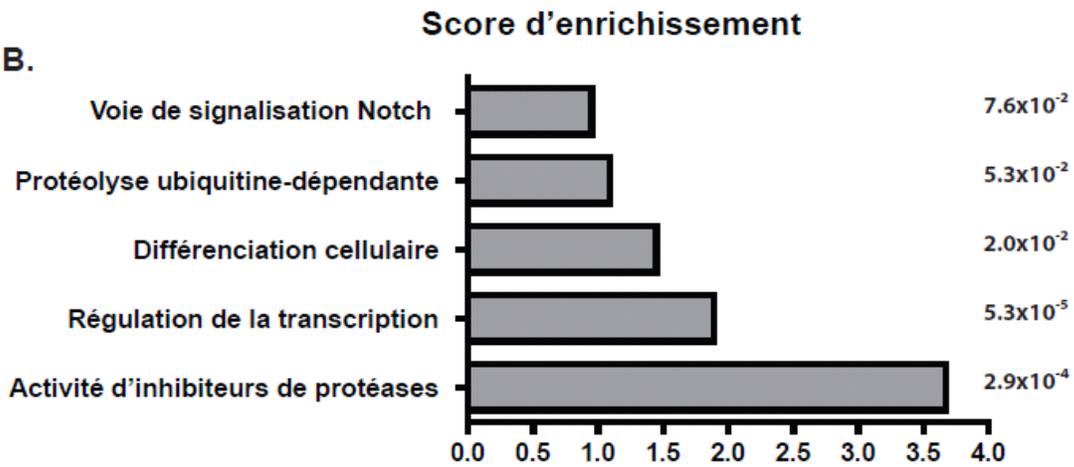
Sur la base de l'essai luciférase que nous avons développé, nous avons alors effectué, en collaboration avec la plateforme de criblage haut-débit de l'IRIC, un crible shARN pan-génomique pour trouver des régulateurs de Dll1 dans la cellule émettrice du signal. Notre modèle expérimental nous a permis d'identifier des modulateurs de Dll1 et d'évaluer de façon quantitative leurs effets sur les niveaux de trans-activation de Notch. Au total, nous avons testé 15 893 gènes de souris que nous avons déplétés dans la lignée OP9-DL1 par transduction lentivirale de shARNs, en utilisant la librairie « MISSION TRC (The RNAi Consortium) » de Sigma. Nous avons ainsi évalué 3 clones de shARNs indépendants par gène, visant différentes portions de l'ARNm cible. L'effet individuel d'inhibition du signal Notch par chaque shARN a

été calculé par soustraction du signal de bruit de fond obtenu avec les cellules HeLa seules, et par normalisation du signal de luminescence résultant à celui du contrôle shNT (Figure 6A). Nous avons considéré comme régulateur positif de Dll1 tout gène dont la moyenne d'inhibition des 2 clones shARNs les plus forts est plus élevée que le double de l'écart-type. D'après ce critère, le seuil de positivité a été établi à 34.4% d'inhibition de la trans-activation de Notch. Ceci a permis l'identification de 665 gènes comme régulateurs positifs de Dll1. La déplétion de *Dll1* ainsi que celle de *Mib1* ont conduit à une très forte inhibition du signal; et des régulateurs connus de la voie Notch comme la *clathrine* (Meloty-Kapella, Shergill et al. 2012), ou *Tspan10* (Dornier, Coumailleau et al. 2012) qui régule le trafic d'ADAM10, ont été identifiés, validant ainsi notre approche expérimentale. De plus, nous avons effectué divers cribles de confirmation où nous avons répété l'essai luciférase primaire sur les régulateurs positifs afin de vérifier leurs phénotypes. Nous avons ainsi pu valider 166 gènes à partir des régulateurs primaires (Tableau IV). L'analyse fonctionnelle de ces 166 gènes validés utilisant le logiciel DAVID « The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery v6.7 » (Huang da, Sherman et al. 2009, Huang da, Sherman et al. 2009) a révélé cinq catégories fonctionnelles principales; la fonction biologique la plus enrichie étant celle de l'activité d'inhibiteurs de protéases, alors que la catégorie avec le nombre le plus élevé de gènes est celle de la régulation de transcription (Figure 6B).

A.



B.



**Figure 6 :** Résultats du crible primaire à essai luciférase.

A. Graphique de nuage de points correspondants aux shARNs individuels testés pour l'inhibition du rapporteur luciférase de Notch par rapport à shNT. B. Classification fonctionnelle des 166 régulateurs primaires validés à l'aide du logiciel DAVID. Les catégories sont classées par score d'enrichissement.

Les valeurs-p sont affichées à droite du graphique.

<b>Symbole du gène</b>	<b>Moyenne d'inhibition de Notch (%)</b>
<i>Mib1</i>	86.6
<i>F5</i>	67.2
<i>Ly6k</i>	65.1
<i>Ndc80</i>	64.7
<i>Anapc7</i>	64.4
<i>Ebfl</i>	63.8
<i>Ctrl</i>	61.6
<i>Slc35a1</i>	60.9
<i>Timp1</i>	59.8
<i>Cdc37</i>	58.8
<i>Sparc</i>	58.4
<i>Il1rapl2</i>	58.3
<i>Lgl1</i>	57.8
<i>Lxn</i>	56.1
<i>Arhgef10</i>	55.5
<i>Afg3l1</i>	55.3
<i>Dll1</i>	54.5
<i>Hgs</i>	53.4
<i>Ube2g2</i>	53.2
<i>Vmn1r42</i>	52.2
<i>LOC433477</i>	52.1
<i>Slc4a9</i>	52.0
<i>Tmem128</i>	51.9
<i>Adamts13</i>	48.8
<i>Adssl1</i>	48.3
<i>Zbtb20</i>	48.0
<i>Txn2</i>	47.8
<i>Serpina1e</i>	46.6
<i>Ccdc88a</i>	46.2
<i>Lhx2</i>	45.9
<i>Ntng2</i>	45.6
<i>Prdm16</i>	45.3
<i>Psm11</i>	45.3
<i>Prss36</i>	45.1
<i>Hsf4</i>	45.1
<i>Tyk2</i>	45.1
<i>Krt28</i>	44.8

<b>Symbole du gène</b>	<b>Moyenne d'inhibition de Notch (%)</b>
<i>Rpl13</i>	34.3
<i>Ankrd55</i>	34.3
<i>Tmem30c</i>	33.7
<i>Olfr1037</i>	33.7
<i>Mobkl1b</i>	33.7
<i>2810021J22Rik</i>	33.6
<i>Rbbp9</i>	33.5
<i>Mxd1</i>	33.3
<i>Prkcc</i>	33.3
<i>Olfr1215</i>	33.3
<i>Kif18b</i>	33.2
<i>Epha3</i>	33.1
<i>Keg1</i>	32.9
<i>Fam82b</i>	32.9
<i>Coro2a</i>	32.8
<i>Phf11</i>	32.8
<i>Gm1246</i>	32.7
<i>Txnip</i>	32.7
<i>Ncf2</i>	32.6
<i>Ppp1r7</i>	32.6
<i>Ywhaz</i>	32.5
<i>Adarb1</i>	32.5
<i>Gmnn</i>	32.5
<i>Evx2</i>	32.5
<i>Slc25a15</i>	32.4
<i>Adam26b</i>	32.3
<i>Top3b</i>	32.2
<i>5730416F02Rik</i>	32.2
<i>Nop10</i>	32.0
<i>Ube2i</i>	31.9
<i>Onecut2</i>	31.4
<i>1700011A15Rik</i>	31.3
<i>Ankrd54</i>	31.3
<i>Pik3r5</i>	31.3
<i>LOC435477</i>	31.0
<i>Xrcc5</i>	30.7
<i>Zfat</i>	30.7

<i>Serpina1f</i>	44.7
<i>Slc2a2</i>	44.2
<i>Cpn2</i>	43.6
<i>Zmynd8</i>	43.4
<i>Prkrir</i>	42.6
<i>Foxn3</i>	42.5
<i>LOC432816</i>	42.0
<i>Immt</i>	42.0
<i>Vrk1</i>	42.0
<i>Pou3f4</i>	41.9
<i>Nol9</i>	40.8
<i>Creg1</i>	40.7
<i>Nf1b</i>	40.4
<i>Slpr2</i>	40.3
<i>Tdpoz2</i>	40.1
<i>Magi3</i>	39.9
<i>Klk1b3</i>	39.8
<i>Chst4</i>	39.2
<i>Tspan10</i>	38.7
<i>LOC327891</i>	38.5
<i>Rngtt</i>	38.5
<i>Mobkl2c</i>	38.5
<i>Cnksr3</i>	38.5
<i>Ms4a6d</i>	37.8
<i>Gla1</i>	37.7
<i>Zfp641</i>	37.7
<i>Tcea2</i>	37.5
<i>Tbpl2</i>	37.5
<i>LOC436380</i>	37.5
<i>Gm14757</i>	36.7
<i>Pias1</i>	36.7
<i>Ell3</i>	36.5
<i>Usp7</i>	36.3
<i>Notch3</i>	36.1
<i>Mapkbp1</i>	36.0
<i>Clpx</i>	35.7
<i>Lrrc28</i>	35.7
<i>Kremen2</i>	35.7
<i>Hand1</i>	35.3
<i>Serpina10</i>	35.2
<i>Slc26a9</i>	35.2

<i>Rhox3a</i>	30.5
<i>Slc13a3</i>	30.4
<i>Dlx4</i>	30.2
<i>Rpl9</i>	30.2
<i>BC048562</i>	30.0
<i>Tcam1</i>	30.0
<i>Irx2</i>	29.9
<i>Usp12</i>	29.8
<i>Ccnt2</i>	29.8
<i>Lce3f</i>	29.6
<i>Pacsin1</i>	29.6
<i>LOC433577</i>	29.6
<i>Olfir901</i>	29.6
<i>Plaur</i>	29.5
<i>Zfp715</i>	29.3
<i>Dedd</i>	29.3
<i>Itih4</i>	29.2
<i>Fat3</i>	29.2
<i>Tnfrsf10b</i>	29.1
<i>Ube2v2</i>	28.9
<i>Rfx2</i>	28.9
<i>Abhd14b</i>	28.8
<i>Serpinb6c</i>	28.8
<i>Iars</i>	28.7
<i>Cdc20b</i>	28.6
<i>Lmod1</i>	28.4
<i>Madd</i>	28.4
<i>Hsfy2</i>	28.2
<i>Hrh4</i>	28.1
<i>Zfp7</i>	28.0
<i>Abca2</i>	27.9
<i>Kank1</i>	27.8
<i>Pbx3</i>	27.6
<i>Il27</i>	27.5
<i>Gm5129</i>	27.4
<i>Gar1</i>	27.0
<i>Serpinb3c</i>	26.9
<i>Zfp952</i>	26.7
<i>Barx2</i>	26.7
<i>Nobox</i>	26.5
<i>Chrm5</i>	26.5

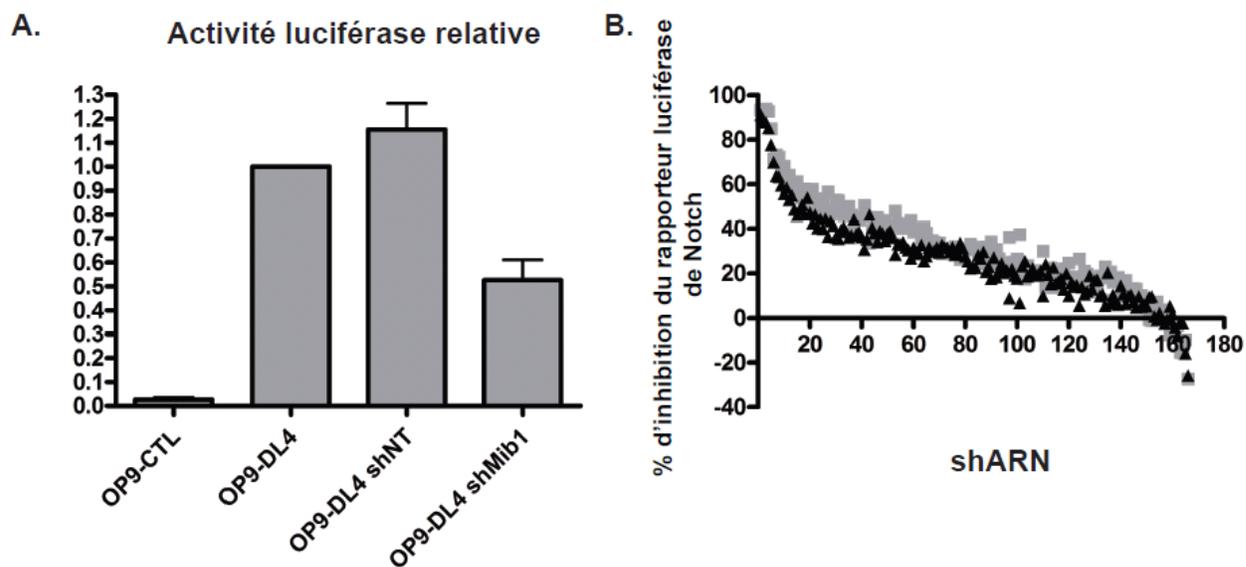
<i>Kif5c</i>	35.1	<i>Lrrc48</i>	26.4
<i>Serpib8</i>	35.1	<i>LOC385069</i>	26.4
<i>Hecw1</i>	34.8	<i>Krt83</i>	26.3
<i>Rhox4e</i>	34.8	<i>Stk3</i>	26.1
<i>Nkx2-1</i>	34.5	<i>Cltc</i>	26.1

**Tableau IV :** Tableau récapitulatif des phénotypes des 166 gènes validés à partir du crible primaire à essai luciférase.

Pour chaque gène, la valeur indiquée représente la moyenne d'inhibition du rapporteur luciférase de Notch par le shARN le plus fort testé en duplicata par rapport à shNT dans le dernier crible de confirmation effectué sur OP9-DL1.

### 3.3. Validation des régulateurs avec le ligand Delta-like4

Par la suite, nous avons utilisé des cellules OP9 exprimant un autre ligand DSL; le ligand Delta-like4, afin de valider les 166 gènes confirmés. En effet, tel que mentionné précédemment, Dll1 et Dll4 sont connus comme ayant des fonctions moléculaires comparables, et comme étant régulés de façon similaire par ubiquitination Mib1-dépendante, endocytose, et recyclage (Shah, Mohtashami et al. 2012). Pour cela, nous avons mis au point le même type d'essai luciférase de trans-activation de Notch, mais cette fois en utilisant les cellules OP9-DL4 comme cellules émettrices (Figure 7A). Chacun des 166 gènes a été déplété dans la lignée OP9-DL4 en utilisant le clone shARN le plus fort des cribles primaire et de confirmation en duplicata. Ce crible secondaire nous a permis de confirmer 80 gènes, à partir des 166 gènes initialement testés, comme régulateurs communs des ligands DSL de la famille Delta-like. Le seuil étant établi à 29% d'inhibition par rapport à shNT (Figure 7B et Tableau V).



**Figure 7 :** Mise au point et résultats du crible secondaire à essai luciférase.

A. Essai luciférase de trans-activation de Notch montrant que l'activité luciférase relative dans les cellules HeLa est efficacement réduite par co-culture avec des cellules OP9-DL4 transduites avec le shARN contre *Mib1* en comparaison à des cellules OP9-DL4 non-transduites. Les données proviennent d'au moins 3 expériences distinctes, et elles représentent la moyenne et la SEM. B. Graphique de nuage de points correspondant aux duplicatas des 166 shARNs testés dans la lignée OP9-DL4 pour l'inhibition du rapporteur luciférase de Notch par rapport à shNT.

Symbole du gène	Moyenne d'inhibition de Notch (%)
<i>Il27</i>	92.3
<i>Klkb3</i>	91.1
<i>Dll1</i>	90.8
<i>Mib1</i>	89.0
<i>Tspan10</i>	81.3
<i>Psm11</i>	70.7
<i>Rpl9</i>	68.5
<i>Txn2</i>	67.8
<i>Sparc</i>	63.2
<i>LOC436380</i>	61.9
<i>Krt28</i>	60.8

Symbole du gène	Moyenne d'inhibition de Notch (%)
<i>Cdc37</i>	40.7
<i>Ppp1r7</i>	40.3
<i>Il1rapl2</i>	39.9
<i>Pou3f4</i>	39.9
<i>Lce3f</i>	39.9
<i>F5</i>	39.7
<i>Notch3</i>	39.5
<i>Usp12</i>	39.5
<i>BC048562</i>	39.2
<i>Adarb1</i>	39.1
<i>Slc2a2</i>	38.9

<i>Anapc7</i>	58.7	<i>Mxd1</i>	38.7
<i>Pbx3</i>	55.9	<i>Cdc20b</i>	38.2
<i>Cltc</i>	55.0	<i>Chst4</i>	37.8
<i>Ndc80</i>	53.6	<i>Tnfrsf10b</i>	37.2
<i>Cnksr3</i>	52.4	<i>Lmod1</i>	37.1
<i>Ctrl</i>	52.3	<i>Ms4a6d</i>	36.9
<i>Mobkl1b</i>	52.1	<i>Rpl13</i>	36.4
<i>Serpina1e</i>	51.1	<i>LOC435477</i>	35.3
<i>Afg3l1</i>	51.1	<i>Gmnn</i>	34.9
<i>Adamtsl3</i>	50.1	<i>LOC385069</i>	34.5
<i>Clpx</i>	48.5	<i>LOC433477</i>	34.5
<i>Slc35a1</i>	47.0	<i>Kif5c</i>	34.3
<i>Rngtt</i>	46.9	<i>Lrrc28</i>	32.9
<i>Serpina1f</i>	46.8	<i>Lxn</i>	32.9
<i>Mobkl2c</i>	46.5	<i>Pias1</i>	32.6
<i>Zmynd8</i>	46.5	<i>Gm5129</i>	32.3
<i>Kif18b</i>	44.9	<i>Slc4a9</i>	32.0
<i>Tyk2</i>	44.7	<i>Timp1</i>	32.0
<i>Gm1246</i>	44.5	<i>Foxn3</i>	31.5
<i>Pik3r5</i>	44.1	<i>Xrcc5</i>	30.8
<i>Dedd</i>	44.0	<i>Rhox3a</i>	30.5
<i>Itih4</i>	43.1	<i>Ncf2</i>	30.5
<i>Nfib</i>	43.1	<i>Lhx2</i>	30.4
<i>Fam82b</i>	43.1	<i>Serpib8</i>	30.3
<i>Zfat</i>	41.6	<i>lrrc48</i>	30.2
<i>Top3b</i>	41.6	<i>Tmem128</i>	30.0
<i>Nol9</i>	41.3	<i>Kremen2</i>	29.9
<i>Hecw1</i>	41.2	<i>Prdm16</i>	29.1
<i>Tmem30c</i>	40.7	<i>Hsfy2</i>	29.1

**Tableau V** : Tableau récapitulatif des phénotypes des 80 régulateurs les plus forts du crible secondaire à essai luciférase.

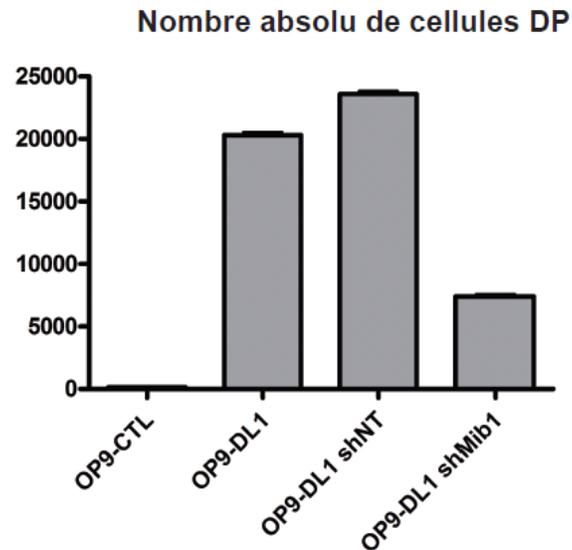
Pour chaque gène, la valeur indiquée représente la moyenne d'inhibition du rapporteur luciférase de Notch par le shARN le plus fort testé en duplicata par rapport à shNT dans le crible luciférase effectué sur OP9-DL4.

### **3.4. Crible secondaire fonctionnel basé sur la différenciation des DN3 WT**

Nous avons ensuite développé un essai secondaire en collaboration avec le groupe de Dr Trang Hoang, en particulier avec Dr Bastien Gerby, afin d'explorer la fonction des nouveaux régulateurs des ligands dans l'activation physiologique de la signalisation Notch. Nous nous sommes concentrés sur l'implication de Notch dans le système immunitaire (Radtke, MacDonald et al. 2013), précisément dans le développement des cellules T à partir des thymocytes ou progéniteurs de cellules T. Tel que décrit dans l'introduction, les cellules T sont produites dans le thymus où la signalisation Notch est requise pour la spécification de la lignée T et pour la différenciation des thymocytes DN en cellules DP (Tan, Visan et al. 2005, Yashiro-Ohtani, Ohtani et al. 2010). Dans ce contexte, les récepteurs NOTCH1 exprimés par les progéniteurs hématopoïétiques sont activés par les ligands DLL4 exprimés par les cellules épithéliales du cortex thymique (Tan, Visan et al. 2005, Bajoghli, Aghaallaei et al. 2009, Shah and Zuniga-Pflucker 2012).

Fait intéressant, les cellules stromales OP9-DL1 ont la capacité de reproduire le microenvironnement du thymus dans des systèmes de co-culture *in vitro*, et de soutenir efficacement la différenciation de divers progéniteurs hématopoïétiques en cellules T, par activation de la signalisation Notch (Zuniga-Pflucker 2004). Nous avons alors profité de ce système pour évaluer l'importance des 80 régulateurs communs de Dll1 et Dll4, nouvellement identifiés, dans l'étape de transition DN3 à DP Notch-dépendante. Pour cela, nous avons mis au point un essai robuste où les cellules OP9-DL1, préalablement transduites avec des shARNs contre les gènes cibles, sont co-cultivées pendant 4 jours avec des thymocytes DN3 isolés fraîchement de souris WT. La différenciation de ces cellules DN3 en cellules DP *in vitro* a été par la suite analysée par cytométrie en flux en utilisant des marqueurs de surface (Figure 8). Ainsi, chacun des 80 gènes fut déplété dans les cellules OP9-DL1 en utilisant le clone shARN le plus fort des cribles primaire et de confirmation (4 réplicats par shARN). Le nombre absolu de cellules DP obtenues a été évalué par FACS, et l'inhibition de la différenciation en DP a été estimée en comparant le nombre de cellules DP à celui obtenu avec les cellules OP9-DL1 non infectées comme contrôles. Ce crible secondaire a permis

l'identification de 46 gènes principalement impliqués dans la différenciation des cellules T Notch-dépendante (Tableau VI). Ces 46 gènes ont été par la suite re-testés dans le cadre du même essai de différenciation utilisant la déplétion par le shARN le plus fort (6 réplicats par shARN) afin de confirmer définitivement leur fonction dans la transition DN3-DP (Figure 9).



**Figure 8 :** Mise au point du crible secondaire basé sur la différenciation des DN3 WT.

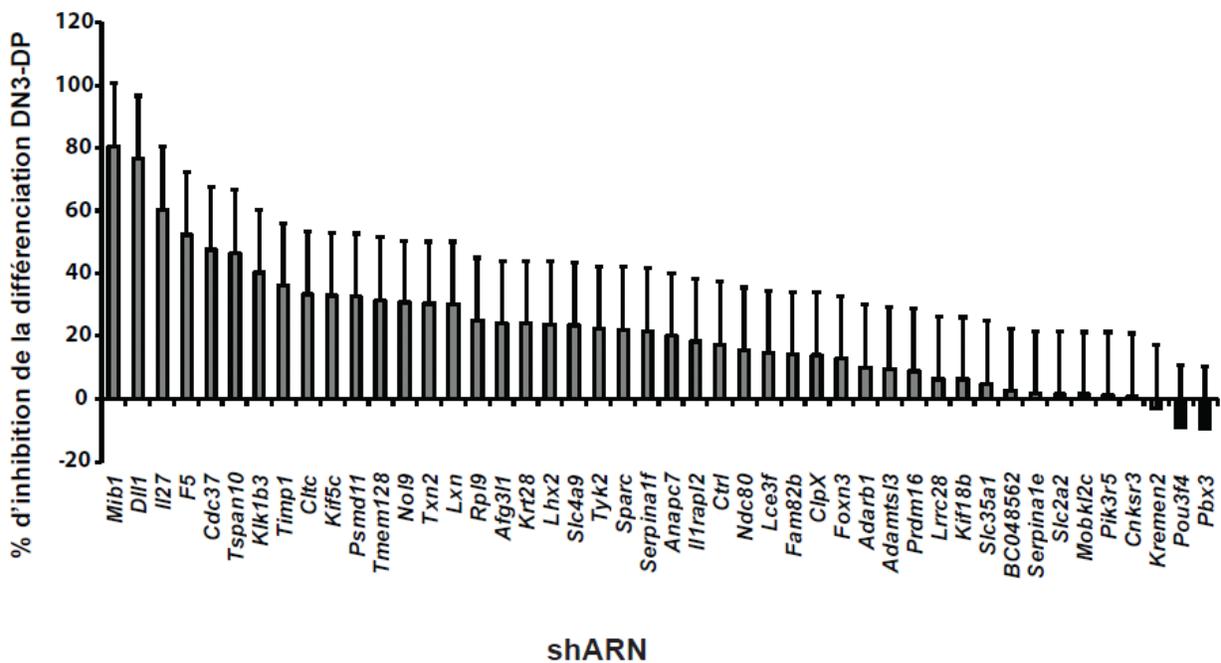
Essai de différenciation montrant que la transition des DN3 en DP est efficacement réduite par co-culture avec des cellules OP9-DL1 transduites avec le shARN contre *Mib1* en comparaison à des cellules OP9-DL1 non-transduites. 5000 cellules DN3 ont été rajoutées au 1<sup>er</sup> jour de co-culture. Les données proviennent d'une expérience représentative et elles illustrent la moyenne et la SEM.

<b>Symbole du gène</b>	<b>Moyenne d'inhibition de la différenciation des DN3 (%)</b>
<i>Mib1</i>	62.8
<i>F5</i>	59.1
<i>Dll1</i>	53.6
<i>Cdc37</i>	53.1
<i>Klk1b3</i>	50.0
<i>Timp1</i>	48.4
<i>Krt28</i>	46.6
<i>Psm11</i>	46.2
<i>Prdm16</i>	46.1
<i>Cltc</i>	45.9
<i>Txn2</i>	45.5
<i>Fam82b</i>	44.7
<i>Tmem128</i>	43.8
<i>Il27</i>	41.6
<i>Nol9</i>	41.3
<i>Il1rap12</i>	40.8
<i>Rpl9</i>	39.9
<i>Serpina1f</i>	38.2
<i>Anapc7</i>	37.5
<i>Kif5c</i>	36.6
<i>Sparc</i>	35.0
<i>Afg3l1</i>	34.5
<i>Pbx3</i>	32.2
<i>Tspan10</i>	31.8
<i>Slc2a2</i>	31.6
<i>Slc4a9</i>	31.6
<i>Kif18b</i>	28.8
<i>Lhx2</i>	27.3
<i>BC048562</i>	26.1
<i>Adarb1</i>	25.9
<i>Lxn</i>	25.8
<i>Ndc80</i>	25.7
<i>Slc35a1</i>	24.7
<i>Serpina1e</i>	24.6
<i>Lce3f</i>	24.3
<i>Kremen2</i>	24.3
<i>Mobkl2c</i>	22.7
<i>Pou3f4</i>	22.4
<i>Foxn3</i>	22.3

<i>Tyk2</i>	21.6
<i>Pik3r5</i>	21.1
<i>Lrrc28</i>	20.3
<i>Ctrl</i>	20.0
<i>Adamts13</i>	17.6
<i>Cnksr3</i>	17.0
<i>Clpx</i>	16.3

**Tableau VI :** Tableau récapitulatif des phénotypes des 46 régulateurs les plus forts du crible secondaire basé sur la différenciation des DN3 WT.

Pour chaque gène, la valeur indiquée représente la moyenne d'inhibition de la différenciation DN3-DP par les 4 réplicats du shARN le plus fort, calculée par rapport aux cellules OP9-DL1 non-transduites.

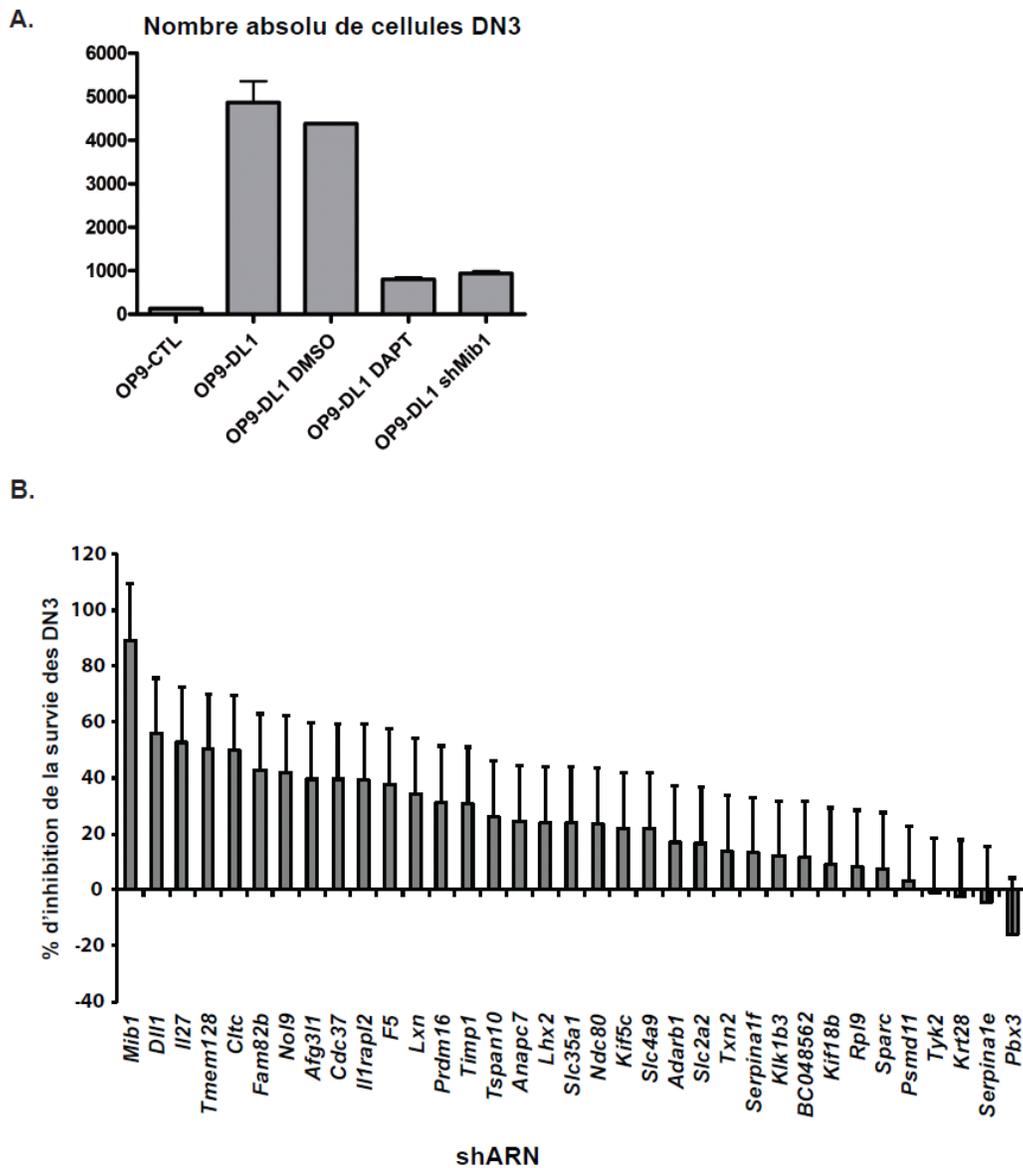


**Figure 9 :** Résultats du crible secondaire de confirmation basé sur la différenciation des DN3 WT.

Moyennes d'inhibition de la différenciation des DN3 en DP par les 46 shARNs les plus forts sélectionnés à partir du crible-pilote de différenciation. Les valeurs sont calculées par rapport aux cellules OP9-DL1 non-transduites, et elles représentent la moyenne de 6 réplicats par shARN. Les barres d'erreurs représentent la SEM.

### 3.5. Crible secondaire fonctionnel basé sur la survie des DN3 pré-leucémiques

D'autre part, en collaboration avec Dr Bastien Gerby et Dr Trang Hoang, nous avons examiné si les gènes validés dans le crible physiologique de différenciation des cellules T sont aussi impliqués dans l'activation pathologique de Notch dans le contexte de la LAL-T. Utilisant le système de co-culture des cellules OP9-DL1, nous avons testé la capacité de ces gènes d'affecter le maintien des cellules souches pré-leucémiques (pré-LSCs) isolées du modèle murin *SCL-LMO1* qui reproduit la LAL-T humaine, et dans lequel *Notch1* a été amplement caractérisé (Tremblay, Tremblay et al. 2010, Gerby, Tremblay et al. 2014). Dans ce modèle, les thymocytes DN3 sont reprogrammés par les oncogènes *SCL-LMO1* en pré-LSCs ayant une activité d'auto-renouvellement, et ce processus est un événement critique pour le développement de la LAL-T (Gerby, Tremblay et al. 2014). Nous avons ainsi mis au point un essai robuste où les cellules OP9-DL1, préalablement transduites avec des shARNs contre les gènes cibles, sont co-cultivées pendant 4 jours avec des thymocytes DN3 isolés fraîchement de souris pré-leucémiques *SCL-LMO1*. La survie de ces cellules DN3 *in vitro* a été par la suite analysée par cytométrie en flux en utilisant des marqueurs de surface (Figure 10A). Ainsi, chacun des gènes ayant été validés dans le crible de différenciation, fut déplété dans les cellules OP9-DL1 en utilisant le clone shARN le plus fort des cribles primaire et de confirmation (4 réplicats par shARN). Le nombre absolu de thymocytes DN3 pré-leucémiques a été évalué par FACS, et l'inhibition de la survie des pré-LSCs a été estimée en comparant le nombre de cellules DN3 viables à celui obtenu avec les cellules OP9-DL1 non infectées comme contrôles (Figure 10B). Cet essai a montré que de nombreux gènes identifiés sont requis pour le maintien des pré-LSCs en culture à travers une signalisation continue de Notch ligand-dépendante.

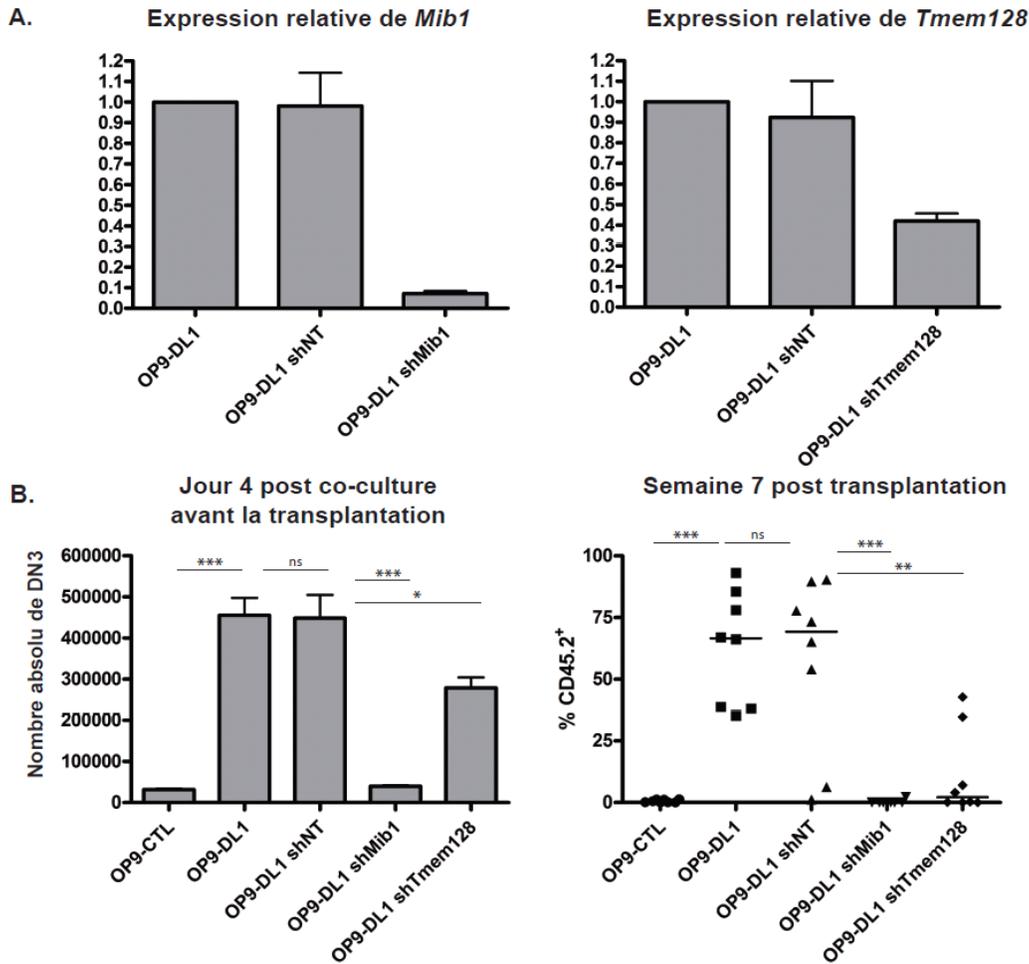


**Figure 10 :** Mise au point et résultats du crible secondaire basé sur la survie des DN3 pré-leucémiques.

A. Essai de survie montrant que le maintien des DN3 pré-leucémiques est efficacement réduit par traitement à l'inhibiteur puissant de la gamma-sécrétase (DAPT), ainsi que par la co-culture avec des cellules OP9-DL1 transduites avec le shARN contre Mib1 en comparaison à des cellules OP9-DL1 non-transduites. 5000 cellules DN3 ont été rajoutées au 1er jour de co-culture. Les données proviennent d'une expérience représentative et elles illustrent la moyenne et la SEM. B. Moyennes d'inhibition de la survie des DN3 pré-leucémiques par les shARNs les plus forts sélectionnés à partir du crible de différenciation. Les valeurs sont calculées par rapport aux cellules OP9-DL1 non-transduites, et elles représentent la moyenne de 4 réplicats par shARN. Les barres d'erreurs représentent la SEM.

### 3.6. Rôle des régulateurs dans l'activité d'auto-renouvellement des cellules souches pré-leucémiques

Les cellules souches pré-leucémiques (pré-LSCs) issues du modèle *SCL-LMO1* sont définies par leur capacité de greffage et d'auto-renouvellement dans le thymus, lorsqu'elles sont transplantées dans des souris receveuses normales irradiées à une dose sous-létale (Tremblay, Tremblay et al. 2010, Gerby, Tremblay et al. 2014). De plus, elles demeurent hautement dépendantes de la force du signal NOTCH1 pour le maintien de leur activité d'auto-renouvellement en culture (Gerby, Tremblay et al. 2014). Par la suite, nous avons collaboré avec Dr Bastien Gerby et Dr Trang Hoang, afin de tester le rôle de *Mib1* et de *Tmem128* « *Transmembrane protein 128* », deux des régulateurs les plus forts du crible de survie des DN3 pré-leucémiques, dans le maintien de l'activité d'auto-renouvellement des pré-LSCs. Pour cela, nous avons effectué une co-culture des thymocytes DN3 pré-leucémiques isolés de souris *SCL-LMO1* avec des cellules OP9-DL1 transduites de façon stable avec des shARNs contre les gènes cibles *Mib1*, et *Tmem128*, et avec shNT comme contrôle négatif. Nous avons commencé par vérifier par qPCR que les niveaux d'expression des gènes cibles ont été efficacement réduits dans les lignées OP9-DL1 stables (Figure 11A). Ensuite, après la co-culture, les pré-LSCs résultantes ont été transplantées par voie intraveineuse dans des souris receveuses WT (Figure 11B, panneau de gauche). Au bout de 7 semaines post-transplantation, les souris receveuses ont été sacrifiées et les thymus ont été analysés par cytométrie en flux afin de déterminer la prise de greffe par les thymocytes provenant des souris donneuses, en utilisant les isoformes CD45.2 pour distinguer les cellules donneuses et receveuses. Ainsi, la prise de greffe a été représentée, pour chaque souris receveuse, par le pourcentage de thymocytes CD45.2<sup>+</sup> provenant des souris donneuses. Remarquablement, nous avons trouvé que la greffe thymique des pré-LSCs a été fortement réduite suivant la co-culture sur le stroma OP9-DL1 déplété en *Tmem128* par comparaison aux stromas contrôles (OP9-DL1 et OP9-DL1 shNT). D'autre part, la greffe thymique des pré-LSCs a été totalement abolie suivant la co-culture sur le stroma OP9-DL1 déplété en *Mib1* (Figure 11B, panneau de droite). Ce résultat suggère que *Mib1* et *Tmem128* sont nécessaires au maintien de l'activité d'auto-renouvellement des pré-LSCs à travers une signalisation Notch ligand-dépendante.

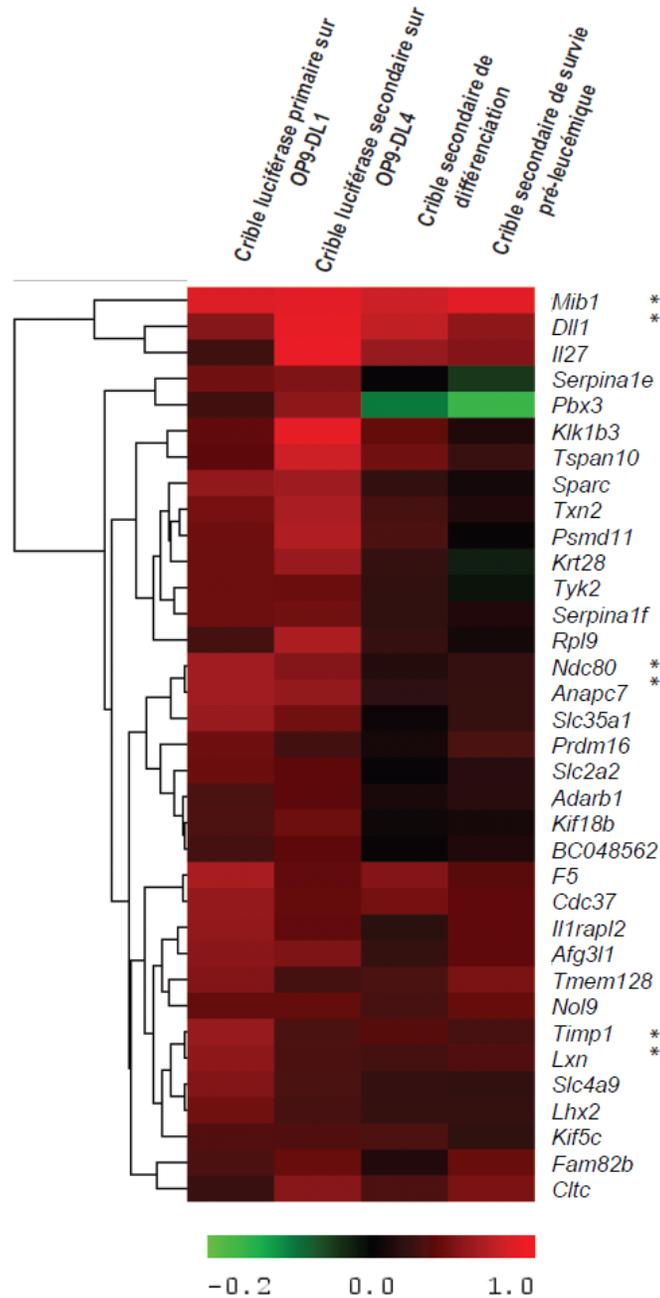


**Figure 11** : Évaluation de l'activité d'auto-renouvellement des pré-LSCs.

A. qPCR montrant que les niveaux d'expression de *Mib1* et de *Tmem128* sont efficacement réduits dans les lignées OP9-DL1 transduites de façon stable avec les shARNs lentiviraux correspondants. Les données proviennent d'au moins 2 expériences indépendantes et représentent la moyenne et la SEM. B. Panneau de gauche: Essai de survie montrant que la déplétion stable de *Mib1* et de *Tmem128* dans les cellules OP9-DL1 réduit respectivement la survie et la prolifération des pré-LSCs de façon significative. 100 000 cellules DN3 pré-leucémiques ont été rajoutées au 1<sup>er</sup> jour de co-culture. Les données représentent la moyenne et la SEM de 8 réplicats par condition. Panneau de droite: Greffe thymique des pré-LSCs résultantes de la co-culture dans des souris receveuses WT. Les données représentent le pourcentage de thymocytes provenant des souris donneuses (CD45.2<sup>+</sup>) par rapport aux thymocytes totaux dans des souris receveuses individuelles. Les lignes indiquent les médianes. N=8 souris receveuses ont été analysées par condition.

### **3.7. Classification hiérarchique des régulateurs les plus forts suivant les données d'inhibition de Notch dans les différents cribles**

Finalement, pour identifier des groupes de gènes à profils similaires dans nos essais de trans-activation de Notch, nous avons effectué une classification hiérarchique des régulateurs les plus forts en se basant sur les phénotypes d'inhibition de leurs shARNs correspondants dans nos différents cribles luciférase et fonctionnels. Cette analyse a été faite en utilisant le logiciel TMEV « TIGR Multiexperiment Viewer », et elle a permis de faire ressortir des gènes qui se comportent de la même façon dans nos essais, et qui sont déjà connus pour avoir des fonctions similaires ou reliées. Ainsi les composants de la voie Notch *Mib1* et *Dll1* sont groupés ensemble dans notre analyse. De même, *Timp1* « *Tissue Inhibitor of Metalloproteinases 1* » et *Lxn* « *Latexin* » qui appartiennent tous les deux à la catégorie fonctionnelle d'inhibiteurs de protéases sont assemblés. *Ndc80* « *NDC80 homolog, kinetochore complex component* » et *Anapc7* « *Anaphase Promoting Complex Subunit 7* » qui sont tous les deux impliqués dans le point de contrôle de sortie de la mitose sont aussi groupés ensemble. Donc, en gros, cette classification hiérarchique de nos données de criblage nous a permis de valider la pertinence fonctionnelle des régulateurs des ligands Delta-like de Notch que nous avons identifiés à travers les différents essais.



**Figure 12** : Récapitulation des données de criblage.

Classification hiérarchique, à l'aide de TMEV, des régulateurs les plus forts des ligands d'après les ratios d'inhibition de Notch par leurs shARNs dans nos différents cribles luciférase et fonctionnels. Les quatre essais de trans-activation de Notch qui ont été effectués dans cette étude sont indiqués au-dessus du graphique. Les gènes ayant des profils similaires le long des quatre essais sont regroupés ensemble.

Les astérisques dénotent des paires de gènes regroupés ensemble dans cette analyse, et déjà connus comme ayant des fonctions similaires ou associées.

## Chapitre 4

## 4. Caractérisation moléculaire préliminaire de nouveaux régulateurs des ligands de Notch

### 4.1. *Tmem128*: Un nouveau régulateur des ligands à fonction préalablement inconnue

*Tmem128* est l'un des nouveaux régulateurs de Dll1/4 les plus puissants que nous avons identifiés dans nos cribles. De plus, ce gène est particulièrement intéressant parce que nous avons montré qu'il est non seulement nécessaire à la survie des pré-LSCs *in vitro*, mais aussi à leur activité d'auto-renouvellement *in vivo*. Par la suite, *Tmem128* constitue une cible thérapeutique potentielle pour la LAL-T, et éventuellement pour d'autres cancers Notch-dépendants. Cependant la fonction moléculaire de *Tmem128* est totalement inconnue, ce qui empêche la mise en place potentielle d'un essai de découverte de drogues pour inhiber sa fonction. Pour cela, nous avons décidé d'entamer une caractérisation préliminaire de ce gène afin d'explorer son mécanisme d'action, et de déterminer s'il serait un bon candidat pour un ciblage pharmacologique potentiel.

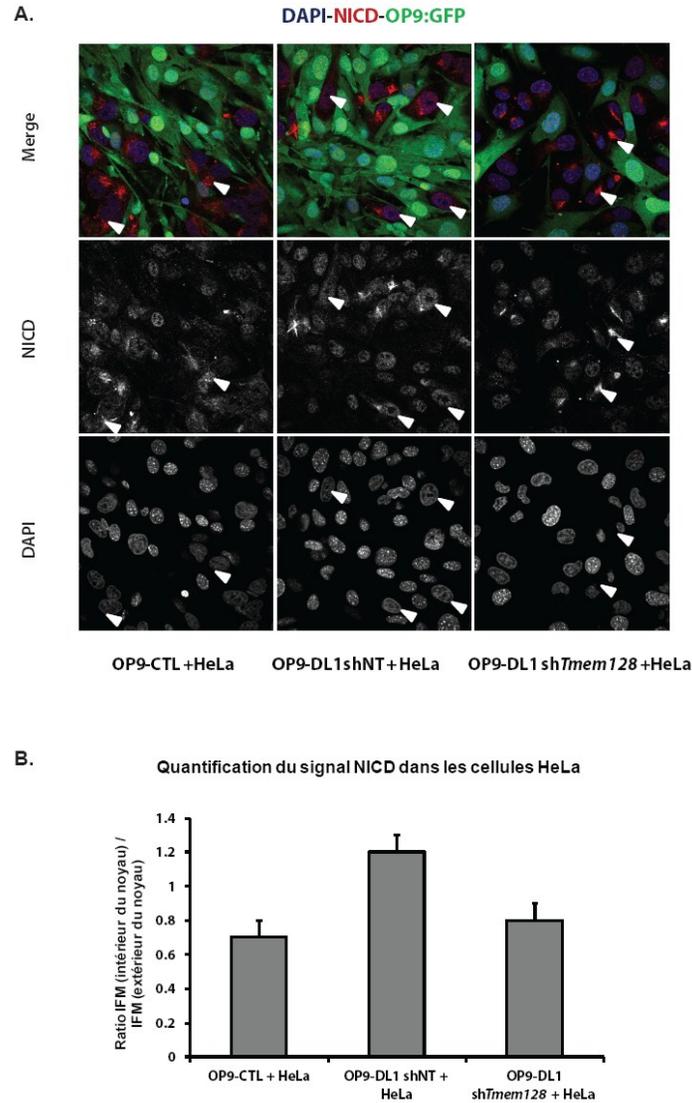
*Tmem128* code pour une protéine à 4 domaines transmembranaires composée de 163 acides aminés. Sa structure consiste en un domaine N-terminal cytoplasmique de 45 acides aminés, 4 domaines transmembranaires séparés par de petites boucles (3-14 acides aminés), et une glycine cytoplasmique en position C-terminale. Un criblage de double hybride a démontré une interaction entre TMEM128 et CLN8 « Ceroid-Lipofuscinosis, Neuronal 8 », une protéine qui se déplace entre le réticulum endoplasmique (RE) et le compartiment intermédiaire entre le RE et le Golgi (Lonka, Kyttala et al. 2000). Conformément à cela, il a été démontré dans une thèse récente que TMEM128 est localisé au RE dans les neurones (Gutzmann, 2013). Les protéines qui contiennent 4 domaines transmembranaires, comme les tétraspanines par exemple, peuvent réguler le transport de cargos, suggérant que TMEM128 pourrait être impliqué dans le transport de DLL1 entre le RE et le Golgi au cours de sa biosynthèse, ou bien dans la rétention de DLL1 au RE, possiblement pour assurer son repliement.

Par la suite, nous avons développé de multiples essais pour essayer de comprendre l'effet de la perte de fonction de *Tmem128* sur Dll1, en comparant à chaque fois la lignée stable OP9-DL1 *shTmem128* (Figure 11A page 88) à la lignée stable OP9-DL1 *shNT*, ou à la lignée OP9-DL1 non transduite.

#### **4.1.1. Confirmation du rôle de *Tmem128* dans la trans-activation de Notch par translocation du NICD au noyau des cellules réceptrices**

Nous avons d'abord commencé par confirmer le rôle de *Tmem128* en tant qu'activateur de la signalisation Notch, en utilisant un essai distinct de celui avec le rapporteur luciférase. En effet, tel que décrit dans l'introduction, il est bien établi que l'activation du récepteur NOTCH1 par les ligands conduit à sa protéolyse et à la libération du fragment actif (NICD) et sa translocation au noyau de la cellule réceptrice. Par la suite, nous avons co-cultivé la lignée stable OP9-DL1 *shTmem128*, ainsi que les lignées contrôles OP9-CTL, et OP9-DL1 *shNT* stable, avec les cellules HeLa exprimant le récepteur NOTCH1. Au bout de 24 heures de co-culture, nous avons effectué un marquage des cellules avec un anticorps permettant de détecter la portion intracellulaire ou C-terminale (NICD) du récepteur NOTCH1. Ensuite, nous avons évalué, par microscopie à fluorescence, la trans-activation de Notch dans chaque condition, en observant la distribution du signal NICD dans le noyau des cellules HeLa réceptrices (les cellules GFP négatives). À noter que les cellules OP9-DL1 expriment elles aussi le récepteur NOTCH1, et un signal NICD est également détecté dans ces cellules émettrices (GFP positives). Ainsi, nous avons trouvé que dans le cas de la co-culture avec OP9-CTL ou OP9-DL1 *shTmem128*, il y a un défaut de translocation du NICD au noyau des cellules HeLa, par comparaison à la co-culture avec OP9-DL1 *shNT* (Figure 13A). Pour confirmer nos observations visuelles, nous avons utilisé le programme « Image J » afin de quantifier, dans les cellules HeLa, l'intensité de fluorescence moyenne (IFM) du signal NICD dans le noyau, ainsi qu'à l'extérieur du noyau. Et à chaque fois, nous avons retranché l'IFM d'une région équivalente où le signal NICD est absent afin d'éliminer le bruit de fond. Ensuite, nous avons calculé le ratio de la fluorescence du NICD à l'intérieur du noyau divisée par la fluorescence du NICD à l'extérieur du noyau. Dans les conditions où il y a activation de la signalisation

Notch, il y aura translocation du NICD au noyau des cellules HeLa, et la distribution du signal de fluorescence va être augmentée dans la région intra-nucléaire. Par conséquent, la valeur de ce ratio sera supérieure ou égale à 1 (Figure 13B).



**Figure 13 :** Effet de la déplétion de *Tmem128* sur la translocation du NICD au noyau des cellules HeLa.

A. Images de fluorescence montrant la distribution du signal NICD en rouge dans les cellules HeLa (bouts de flèches blancs) en co-culture avec des cellules contrôles ou OP9-DL1 sh*Tmem128*. B. Quantification de l'IFM du signal NICD à l'intérieur et à l'extérieur du noyau des cellules HeLa dans les différentes conditions. Les données proviennent de 3 expériences distinctes et représentent la moyenne et la SEM. N=35 cellules ont été analysées par condition.

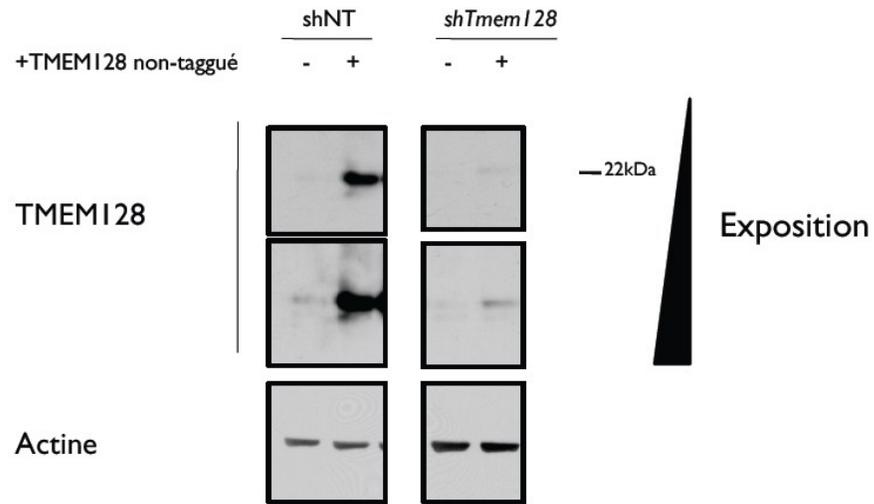
#### **4.1.2. Évaluation de la localisation de TMEM128 dans les cellules OP9-DL1 par immunofluorescence**

Étant donné que la localisation de TMEM128 permettrait de donner une indication sur sa fonction moléculaire potentielle, nous nous sommes interrogés si cette protéine présente une distribution distincte dans nos cellules, ou si elle se retrouve dans le RE tel que suggéré pour d'autres types cellulaires (Lonka, Kytala et al. 2000); (Gutzmann, 2013). Pour cela, nous avons évalué la localisation de TMEM128 dans les cellules OP9-DL1 en utilisant un anticorps commercial contre le domaine N-terminal de TMEM128.

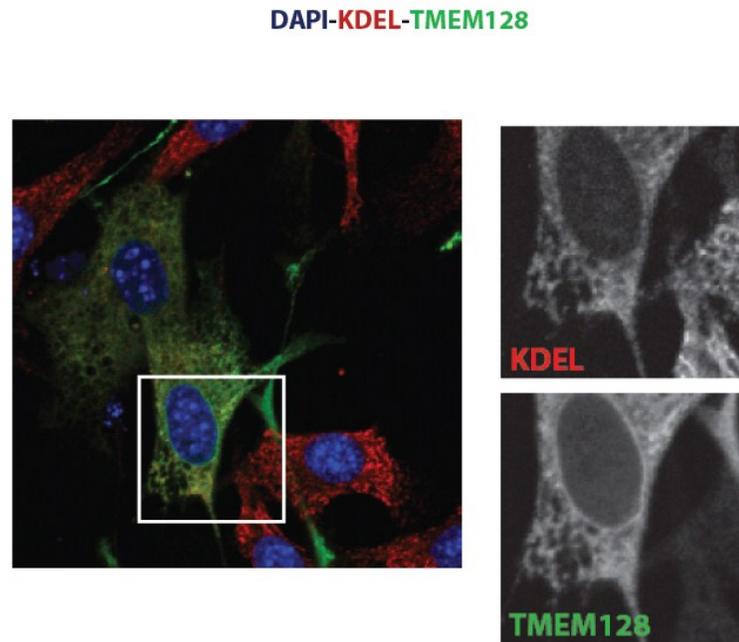
Nous avons d'abord commencé par vérifier la spécificité de cet anticorps par immunobuvardage de type western où nous avons comparé les niveaux d'expression de TMEM128 dans la lignée OP9-DL1 *shTmem128* par rapport à la lignée OP9-DL1 *shNT*. Ainsi, nous avons trouvé que TMEM128 endogène est faiblement exprimé dans les cellules OP9-DL1 (bande faible dans la lignée *shNT* et invisible dans la lignée *shTmem128*), et que la sur-expression d'une forme murine « non-tagguée » de TMEM128 permet de visualiser une bande très évidente, au bon poids moléculaire, dans la lignée *shNT*, et fortement réduite dans la lignée *shTmem128*; confirmant la spécificité de l'anticorps (Figure 14A).

Conformément aux données d'immunobuvardage, le marquage par immunofluorescence des cellules OP9-DL1 a révélé que les niveaux d'expression de TMEM128 endogène étaient trop faibles pour qu'ils puissent être détectés par cette technique. Par la suite, nous avons dû sur-exprimer la forme « non-tagguée » de TMEM128 pour identifier sa localisation. Ainsi un co-marquage avec un anticorps qui reconnaît la séquence KDEL (lysine, acide aspartique, acide glutamique, leucine) de rétention au RE, a révélé que TMEM128 est localisé au RE des cellules OP9-DL1 (Figure 14B).

A.



B.

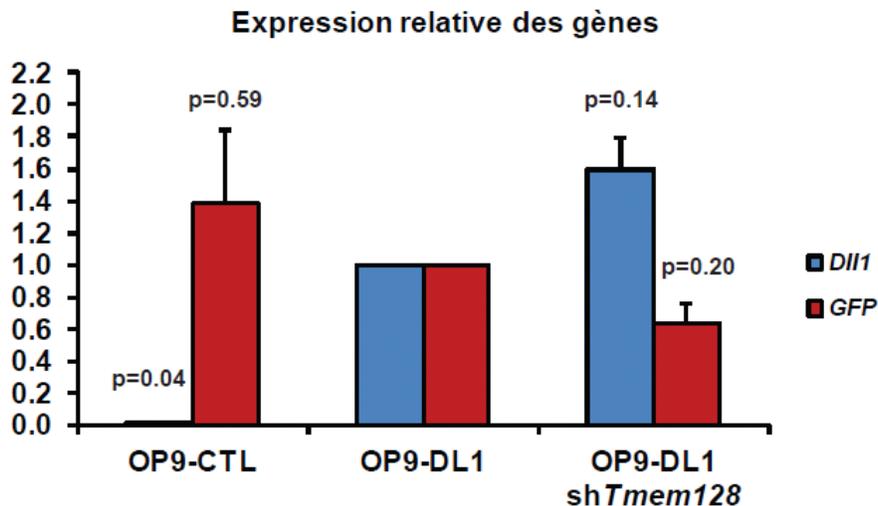


**Figure 14** : Localisation de TMEM128 dans les cellules OP9-DL1.

A. Évaluation par immunobuvardage de type western, de l'expression de TMEM128 endogène ainsi que d'une forme murine non tagguée de TMEM128 transfectée dans les lignées OP9-DL1 shNT et sh*Mem128*. B. Image de fluorescence représentative montrant qu'une forme sur-exprimée de TMEM128 (en vert) co-localise avec le marqueur KDEL du RE (en rouge) dans les cellules OP9-DL1. La région dans le carré blanc est représentée à plus fort grossissement dans les panneaux de droite.

### 4.1.3. Effet de la déplétion de *Tmem128* sur les niveaux d'expression de *Dll1* par qPCR

Par la suite, nous avons évalué par qPCR l'effet de la déplétion de *Tmem128* sur l'expression de l'ARNm de *Dll1*, en utilisant les cellules OP9-CTL et OP9-DL1 comme contrôles. Étant donné que les cellules OP9-CTL expriment la *GFP* seule, et que les cellules OP9-DL1 expriment à la fois *Dll1* et *GFP* à partir du même transcrite bicistronique, nous avons aussi regardé les niveaux d'expression de la *GFP* pour vérifier s'ils sont affectés par la perte de fonction de *Tmem128*. Ceci suggérerait que *Tmem128* régule la transcription des gènes dans la lignée OP9 à travers le promoteur exogène MSCV. Cependant, les expériences de qPCR ont démontré que ni *Dll1* ni la *GFP* ne sont affectés de façon significative par la réduction de l'expression de *Tmem128* dans les cellules OP9-DL1 (Figure 15).

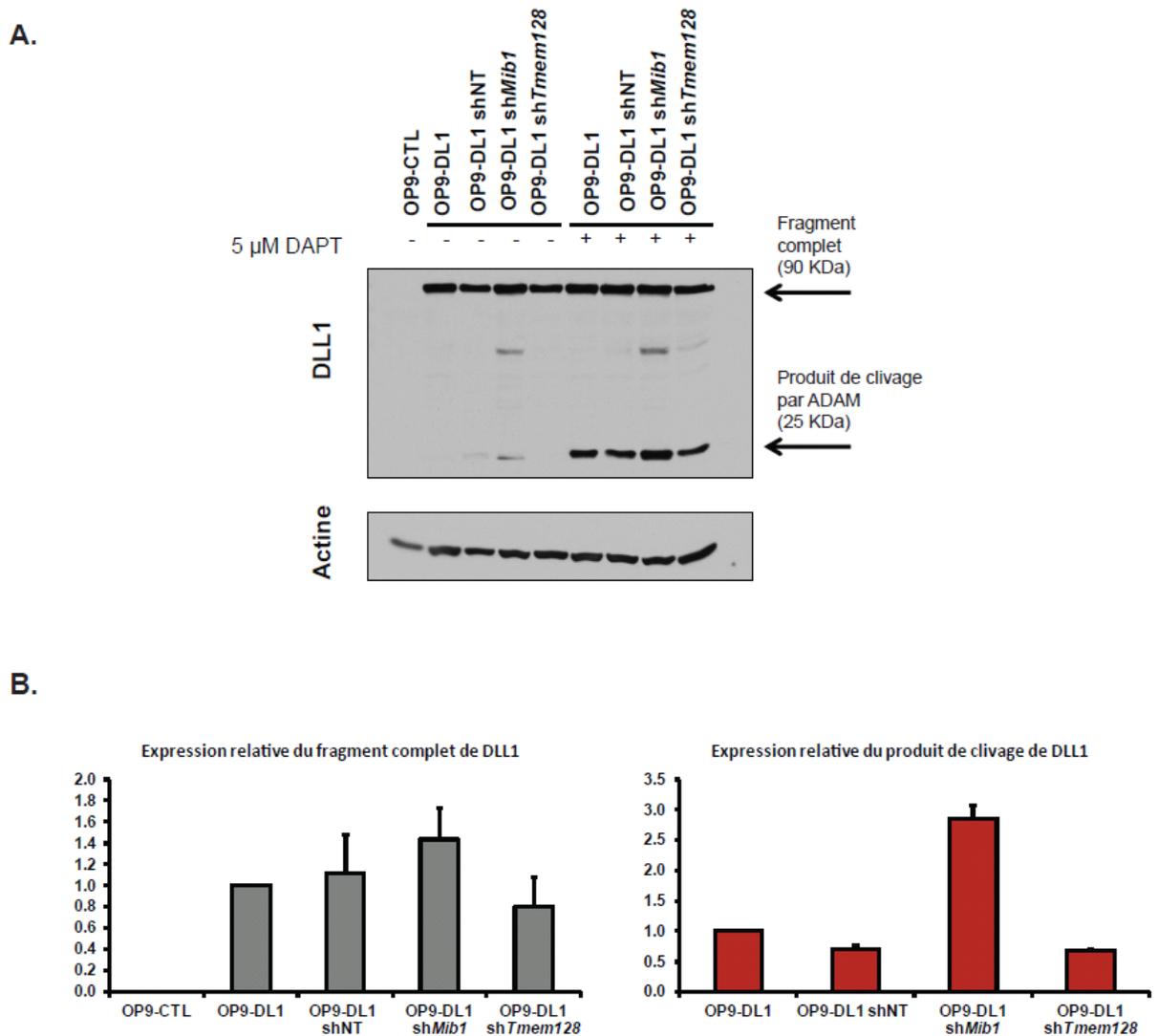


**Figure 15** : Effet de la déplétion de *Tmem128* sur l'expression de *Dll1*.

qPCR montrant que les niveaux d'expression de *Dll1* et de *GFP* ne sont pas affectés de façon significative suite à la déplétion stable de *Tmem128* dans les cellules OP9-DL1. Les données proviennent de 3 expériences indépendantes et représentent la moyenne et la SEM. Les valeurs-p sont affichées au-dessus des histogrammes.

#### **4.1.4. Effet de la déplétion de *Tmem128* sur les niveaux d'expression et la protéolyse de DLL1 par immunobuvardage de type western**

Étant donné que *Tmem128* ne semble pas affecter la transcription de *Dll1* de façon significative, nous nous sommes demandé s'il ne régulerait pas plutôt les niveaux d'expression de la protéine DLL1, ce qui expliquerait les phénotypes d'inhibition de Notch suite à la déplétion de *Tmem128*. Pour cela, nous avons évalué l'effet de la déplétion de *Tmem128* sur l'expression de DLL1, ainsi que sur sa stabilité, en mesurant la quantité globale de DLL1, et sa protéolyse par immunobuvardage de type western. Étant donné que l'endocytose de *Dll1* est *Mib1*-dépendante, et qu'il a été suggéré que l'endocytose des ligands les protégerait contre la protéolyse (Heuss, Tarantino et al. 2013), nous avons aussi testé l'effet de la déplétion de *Mib1* sur l'expression et la stabilité de la protéine DLL1 en utilisant la lignée stable *shMib1* (Figure 11A page 88). Ainsi, nous avons utilisé un anticorps monoclonal anti-T7 pour détecter le domaine intracellulaire de la protéine DLL1, parce que cette dernière est sur-exprimée de façon exogène dans la lignée OP9-DL1, et elle possède un « tag » T7 en position C-terminale. L'anticorps anti-T7 est capable de reconnaître spécifiquement le fragment entier, ainsi que le fragment transmembranaire de DLL1 issu du clivage par ADAM. Vu que DLL1 est séquentiellement clivé par ADAM et par la gamma-sécrétase, nous avons utilisé l'inhibiteur de la gamma-sécrétase (DAPT) afin de stabiliser ce fragment transmembranaire du ligand qui est à la fois le produit d'ADAM et le substrat de la gamma-sécrétase. Ceci nous a permis de bien visualiser ce fragment transitoire de clivage. Cette expérience a démontré que la réduction de l'expression de *Tmem128* dans les cellules OP9-DL1 conduit à une légère réduction de l'expression globale de DLL1 de 20%, mais qu'elle n'affecte pas la protéolyse de DLL1. Au contraire, comme attendu, la déplétion de *Mib1* augmente de 3 fois la proportion du fragment clivé par rapport au fragment complet de DLL1. Cependant, étonnamment, cette augmentation de la protéolyse est aussi accompagnée par une légère augmentation des niveaux du fragment entier de DLL1 (Figure 16). Ceci suggère qu'en plus de favoriser le clivage de DLL1, *shMib1* stabiliserait une forme non fonctionnelle du fragment complet de DLL1 et limiterait son recyclage ou « turn-over ».



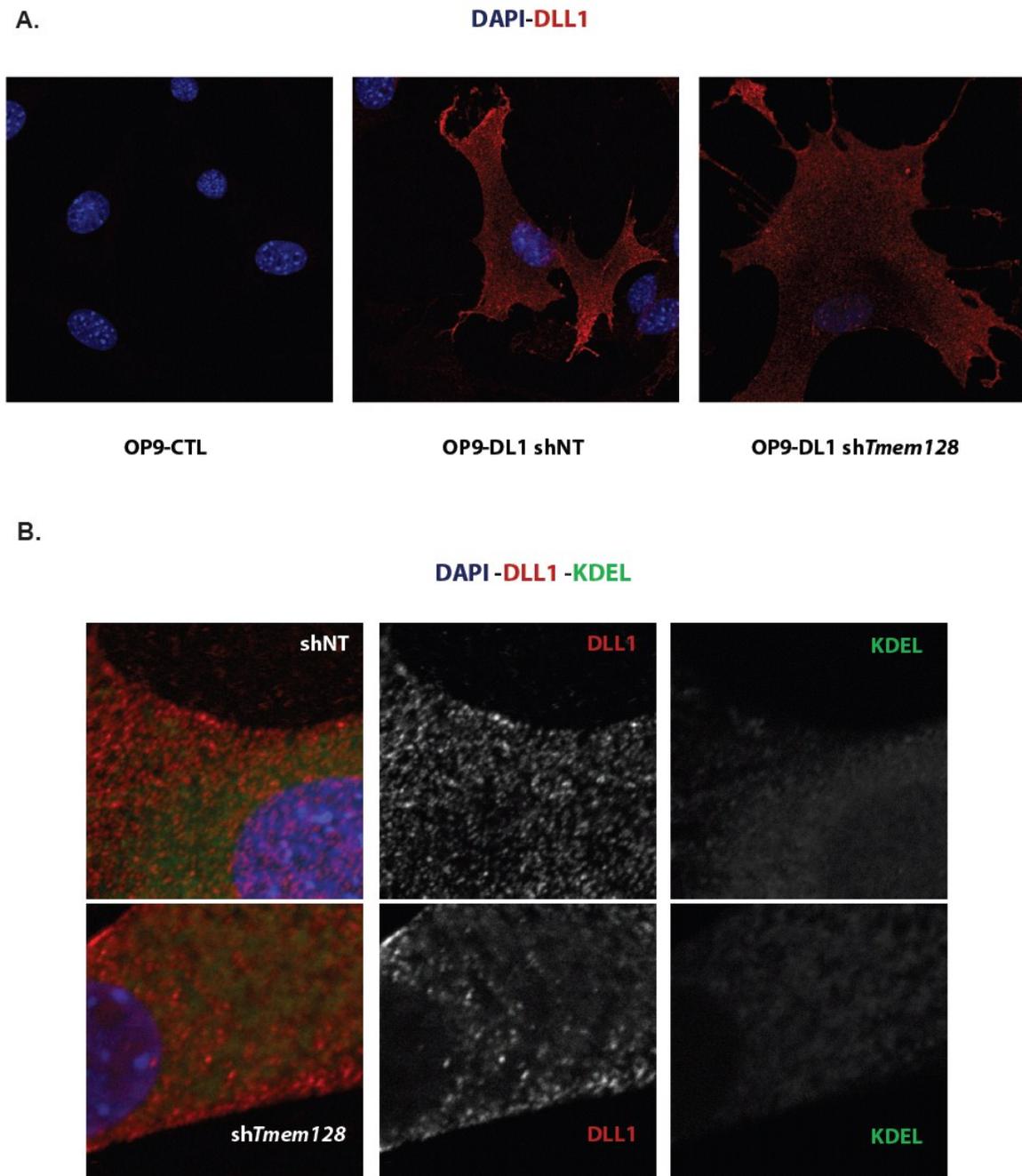
**Figure 16 :** Effet de la déplétion de *Tmem128* sur l'expression et le clivage de DLL1.

A. Expérience d'immunobuvardage représentative montrant la détection dans les cellules OP9-DL1 du fragment complet, ainsi que du fragment transmembranaire clivé de DLL1. B. Graphique de gauche:

Quantification de l'expression relative du fragment entier de DLL1 dans chaque condition, en normalisant à l'intensité de la bande d'actine correspondante. Graphique de droite: Quantification du ratio du fragment clivé par rapport au fragment complet de DLL1 dans chaque condition. Les données proviennent de 3 expériences indépendantes et représentent la moyenne et la SEM. Toutes les valeurs ont été calculées par rapport aux cellules OP9-DL1 non transduites.

#### **4.1.5. Effet de la déplétion de *Tmem128* sur la localisation sub-cellulaire de DLL1 par immunofluorescence**

Compte tenu de l'effet léger de *Tmem128* sur les niveaux d'expression globale de DLL1, nous nous sommes demandé si *Tmem128* ne jouerait pas plutôt un rôle dans la distribution sub-cellulaire du ligand afin d'affecter sa fonction de signalisation. Pour cela, nous avons effectué un marquage par immunofluorescence des cellules OP9-DL1 en utilisant l'anticorps anti-T7 qui reconnaît le domaine intracellulaire du ligand. Cette expérience a montré que la distribution globale de DLL1 dans les cellules OP9-DL1 ne semble pas affectée par la déplétion de *Tmem128*. Ainsi DLL1 est détectée de façon similaire dans des vésicules intracellulaires et à la membrane plasmique dans les deux conditions: shNT, et sh*Tmem128*; suggérant un cycle de trafic normal de DLL1 par endocytose dans les deux cas (Figure 17A). D'autre part, étant donné que TMEM128 a été détecté au RE dans nos cellules, suggérant ainsi une fonction de cette protéine au niveau du RE, nous avons effectué un co-marquage de DLL1 avec le marqueur KDEL afin de vérifier si le ligand ne serait pas piégé au RE au cours de ses étapes précoces de bio-synthèse suite à la déplétion de *Tmem128*. Cependant, encore une fois, cet essai ne nous a pas permis de distinguer une différence nette entre les deux conditions: shNT, et sh*Tmem128*; et nous avons été incapables de détecter DLL1 au RE dans les deux cas (Figure 17B). Donc en gros, nos données suggèrent que, contrairement à toute attente, *Tmem128* ne semble pas contrôler le trafic et la localisation de DLL1 dans les cellules OP9-DL1.



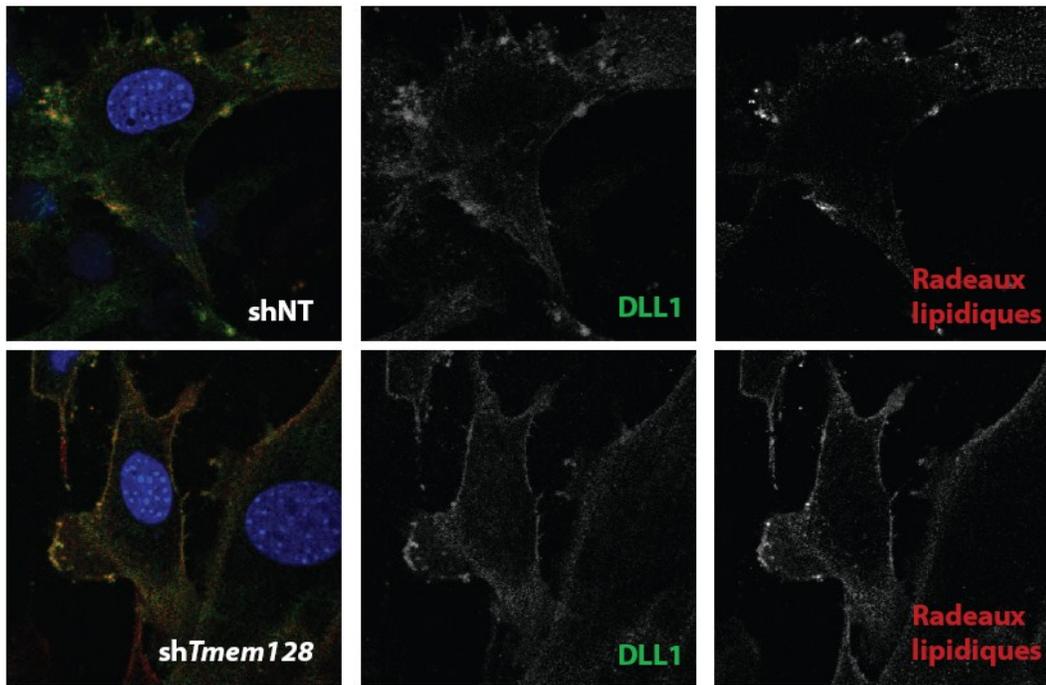
**Figure 17 :** Effet de la déplétion de *Tmem128* sur la localisation sub-cellulaire de DLL1.  
 A. Images représentatives de la distribution de DLL1 (en rouge) dans les cellules contrôles et les cellules OP9-DL1 sh*Tmem128*. B. Images de fluorescence représentatives montrant que DLL1 (en rouge) ne co-localise pas avec le marqueur KDEL du RE (en vert) dans les cellules OP9-DL1 shNT et sh*Tmem128*.

#### **4.1.6. Effet de la déplétion de *Tmem128* sur la distribution de DLL1 dans des microdomaines membranaires: les « radeaux lipidiques » par immunofluorescence**

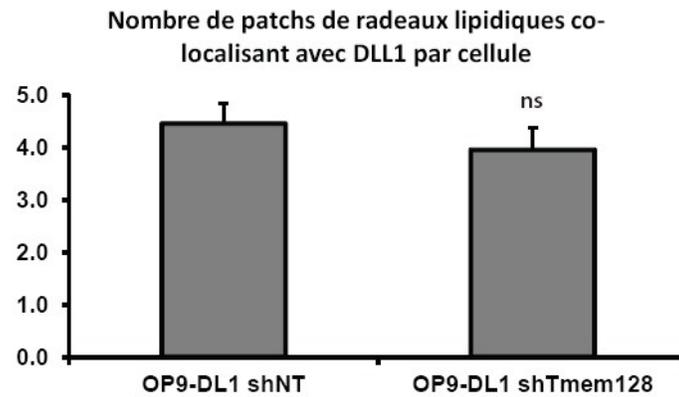
Finalement, nous avons décidé d'évaluer le rôle de *Tmem128* dans la distribution de DLL1 dans des microdomaines membranaires spécifiques: les « radeaux lipidiques ». En effet, ces derniers agissent comme des plateformes de signalisation; et un défaut de localisation de DLL1 à ces microdomaines est associé à une perte de son activité de signalisation (Heuss, Ndiaye-Lobry et al. 2008). Nous avons donc effectué un co-marquage de DLL1 et des « radeaux lipidiques » dans les cellules OP9-DL1 en utilisant d'une part un anticorps qui reconnaît le domaine extracellulaire du ligand, et d'autre part la sous-unité B de la toxine du choléra (CT-B) qui reconnaît spécifiquement le ganglioside GM1 de ces microdomaines. De plus, nous avons rajouté l'anticorps anti-CT-B qui permet la réticulation des « radeaux lipidiques » pour former des patchs distincts à la membrane plasmique. Nous avons ainsi pu visualiser DLL1 et les « radeaux lipidiques » dans les cellules OP9-DL1 par microscopie à fluorescence (Figure 18A). Suite à la quantification des patchs de « radeaux lipidiques » co-localisant avec DLL1 par cellule, nous avons trouvé que la perte de fonction de *Tmem128* n'affecte pas significativement la distribution de DLL1 à ces microdomaines membranaires, qui s'observe normalement dans les deux conditions: shNT, et sh*Tmem128* (Figure 18B). Ce résultat suggère que les défauts de signalisation de DLL1 associés à la déplétion de *Tmem128* ne sont pas dûs à un défaut de localisation du ligand aux « radeaux lipidiques ».

A.

DAPI - DLL1 - Radeaux lipidiques



B.



**Figure 18** : Effet de la déplétion de *Tmem128* sur la localisation de DLL1 aux « radeaux lipidiques ».

A. Images de fluorescence représentatives montrant que DLL1 (en vert) co-localise parfaitement avec les patches de « radeaux lipidiques » (en rouge) à la membrane plasmique des cellules OP9-DL1 shNT et sh*Tmem128*. B. Quantification du nombre moyen de radeaux lipidiques co-localisant avec DLL1 par cellule. Les données proviennent de 2 expériences distinctes et représentent la moyenne et la SEM.

20<N<25 cellules ont été analysées par condition.

#### 4.1.7. Conclusions et perspectives

En conclusion, nos expériences de caractérisation préliminaire de *Tmem128* dans les cellules OP9-DL1 ont confirmé le rôle de ce nouveau régulateur des ligands DSL dans la trans-activation de Notch par translocation du NICD au noyau des cellules réceptrices. En outre, elles ont démontré que la perte de fonction de *Tmem128* n'affecte pas les niveaux d'expression de l'ARNm de *Dll1* de façon significative, mais qu'elle réduit par contre les niveaux d'expression de la protéine DLL1 de l'ordre de 20%. Cependant, nous ne pensons pas que cette réduction soit à elle seule suffisante pour justifier les puissants phénotypes d'inhibition de la signalisation Notch par *shTmem128* dans les différents cribles que nous avons effectués; à moins que la quantité des ligands ne soit extrêmement limitante dans nos essais. D'autre part, nous avons montré que la déplétion de *Tmem128* n'affecte pas la stabilité de DLL1 et sa protéolyse par les enzymes de la famille ADAM, et qu'elle n'affecte pas non plus le trafic et la localisation sub-cellulaire de DLL1 contrairement à notre hypothèse de départ.

La prochaine étape serait de confirmer indubitablement, de manière quantitative, l'absence de l'effet de *Tmem128* sur la localisation sub-cellulaire de DLL1 en effectuant des essais biochimiques ardues de fractionnement cellulaire sur des cellules OP9-DL1 *shNT* et *shTmem128*; et en analysant par immunobuvardage de type western, la quantité de DLL1 dans les différents compartiments cellulaires. Par la suite, l'expérience clé à réaliser pour élucider le mécanisme d'action de *Tmem128* serait d'évaluer l'effet de la déplétion de *Tmem128* sur les modifications post-traductionnelles de DLL1. En effet, il s'agit du seul aspect connu des mécanismes de régulation des ligands DSL que nous n'avons pas encore abordé dans nos expériences de caractérisation de *Tmem128*. De plus, une analyse protéomique des interacteurs de TMEM128 dans la lignée OP9-DL1 fournirait certainement des pistes intéressantes pour explorer son mécanisme d'action sur le ligand DLL1, et permettrait possiblement d'identifier des enzymes régulant les modifications post-traductionnelles de DLL1 tels que des E3 ubiquitine ligases, des kinases, et des glycosyl-transférases.

Finalement, l'analyse protéomique des interacteurs de TMEM128 permettrait de répondre à la question cruciale qui consiste à savoir si cette protéine interagit directement avec DLL1 ou indirectement via un co-facteur, et d'identifier par la suite les sites qui sont responsables de cette interaction. Ceci permettrait à plus long terme de mettre au point des essais chimiques à portée thérapeutique, afin d'identifier de petites molécules capables de bloquer l'action de TMEM128 sur DLL1, en perturbant par exemple l'interaction fonctionnelle entre TMEM128 et son/ses partenaire(s).

## **4.2. *Cdc37*: Un nouveau régulateur des ligands connu comme contrôlant la stabilité des protéines dans le RE**

Notre caractérisation moléculaire préliminaire de *Tmem128* n'ayant pas été très informative en ce qui concerne son mécanisme d'action sur DLL1, nous avons décidé de reporter notre attention sur un autre régulateur nouvellement identifié des ligands Delta-like, mais dont la fonction moléculaire est bien caractérisée. Nous avons sélectionné le gène *Cdc37* « *Cell division cycle 37 homolog* » qui compte parmi les régulateurs les plus puissants que nous avons identifiés dans nos cribles. Ce gène est particulièrement intéressant parce qu'il est impliqué dans diverses pathologies, et il est sur-exprimé dans plusieurs types de cancers (Calderwood 2013). Par la suite, *Cdc37* constituerait une cible thérapeutique potentielle pour les cancers Notch-dépendants dont la LAL-T. Pour cela, nous avons décidé d'entamer une caractérisation préliminaire de ce gène afin d'explorer son mécanisme d'action dans notre système, et de déterminer s'il serait un bon candidat pour un ciblage pharmacologique potentiel.

CDC37 est une protéine résidente du RE, dont la fonction moléculaire est bien caractérisée en tant que partenaire de HSP90 « 90 kDa Heat Shock Protein ». En effet, CDC37 agit comme co-chaperonne moléculaire pour faciliter l'interaction des « protéines clientes » avec HSP90 afin d'assurer leur repliement et leur maturation (Calderwood 2015). La protéine CDC37 est composée de 379 acides aminés. Sa structure consiste en un domaine N-terminal de 148 acides aminés de liaison aux protéines clientes, un domaine central de 144 acides

aminés de liaison à HSP90, et un domaine C-terminal de 87 acides aminés. Seules les structures des domaines central et C-terminal ont été résolues par cristallographie, alors que la structure du domaine N-terminal demeure peu caractérisée. Il a été démontré récemment que la phosphorylation du résidu sérine en position 13 du domaine N-terminal de CDC37 est nécessaire pour sa fonction (Liu and Landgraf 2015).

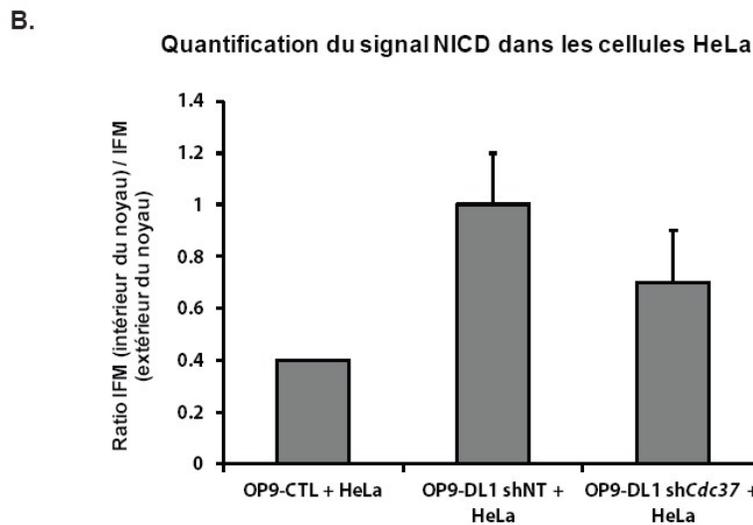
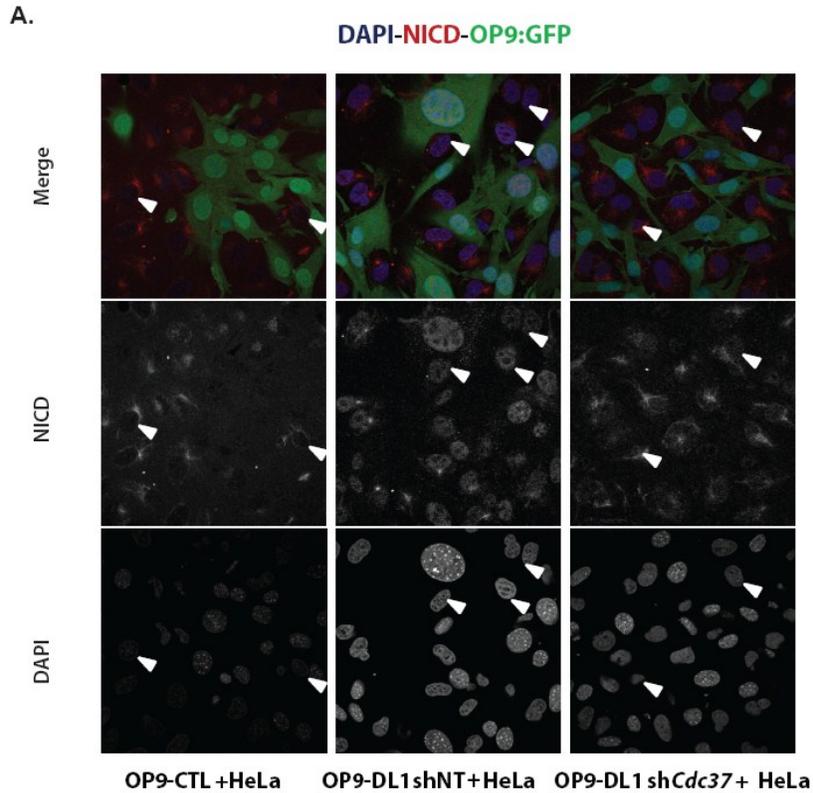
Étant donné que les protéines qui ne réussissent pas le processus de « contrôle qualité » régulé par le complexe HSP90/CDC37 peuvent être adressées à la dégradation, *Cdc37* a été impliqué dans la régulation de la stabilité de nombreuses protéines, en particulier des protéines kinases (Farrell and Morgan 2000, Jinwal, Trotter et al. 2011, Taipale, Krykbaeva et al. 2012, Xu and Neckers 2012). Conformément à cela, nous pensons que *Cdc37* pourrait réguler la stabilité de DLL1 et son repliement au niveau du RE; ou alternativement, qu'il pourrait réguler la stabilité d'un régulateur clé du ligand.

Par la suite, nous avons développé de multiples essais pour essayer de comprendre l'effet de la perte de fonction de *Cdc37* sur Dll1, en comparant à chaque fois la lignée stable OP9-DL1 sh*Cdc37* (Figure 20A page 110) à la lignée stable OP9-DL1 shNT, ou à la lignée OP9-DL1 non transduite.

#### **4.2.1. Confirmation du rôle de *Cdc37* dans la trans-activation de Notch par translocation du NICD au noyau des cellules réceptrices**

Nous avons d'abord commencé par confirmer le rôle de *Cdc37* en tant qu'activateur de la signalisation Notch, en utilisant l'essai de translocation du NICD au noyau des cellules HeLa réceptrices par immunofluorescence. Ainsi, nous avons co-cultivé la lignée stable OP9-DL1 sh*Cdc37*, ainsi que les lignées contrôles OP9-CTL, et OP9-DL1 shNT stable, avec les cellules HeLa exprimant le récepteur NOTCH1. Au bout de 24 heures de co-culture, nous avons effectué un marquage des cellules avec un anticorps permettant de détecter la portion intracellulaire ou C-terminale (NICD) du récepteur NOTCH1. Ensuite, nous avons évalué, par microscopie à fluorescence, la trans-activation de Notch dans chaque condition, en observant la distribution du signal NICD dans le noyau des cellules HeLa réceptrices (les cellules GFP

négatives). Ainsi, nous avons trouvé que dans le cas de la co-culture avec OP9-CTL ou OP9-DL1 sh*Cdc37*, il y a un défaut de translocation du NICD au noyau des cellules HeLa, par comparaison à la co-culture avec OP9-DL1 shNT (Figure 19A). Ces observations visuelles ont été confirmées par quantification, sur le programme « Image J », de l'intensité de fluorescence moyenne (IFM) du signal NICD dans le noyau, ainsi qu'à l'extérieur du noyau des cellules HeLa, en utilisant la même méthode décrite pour *Tmem128* (Figure 19B).



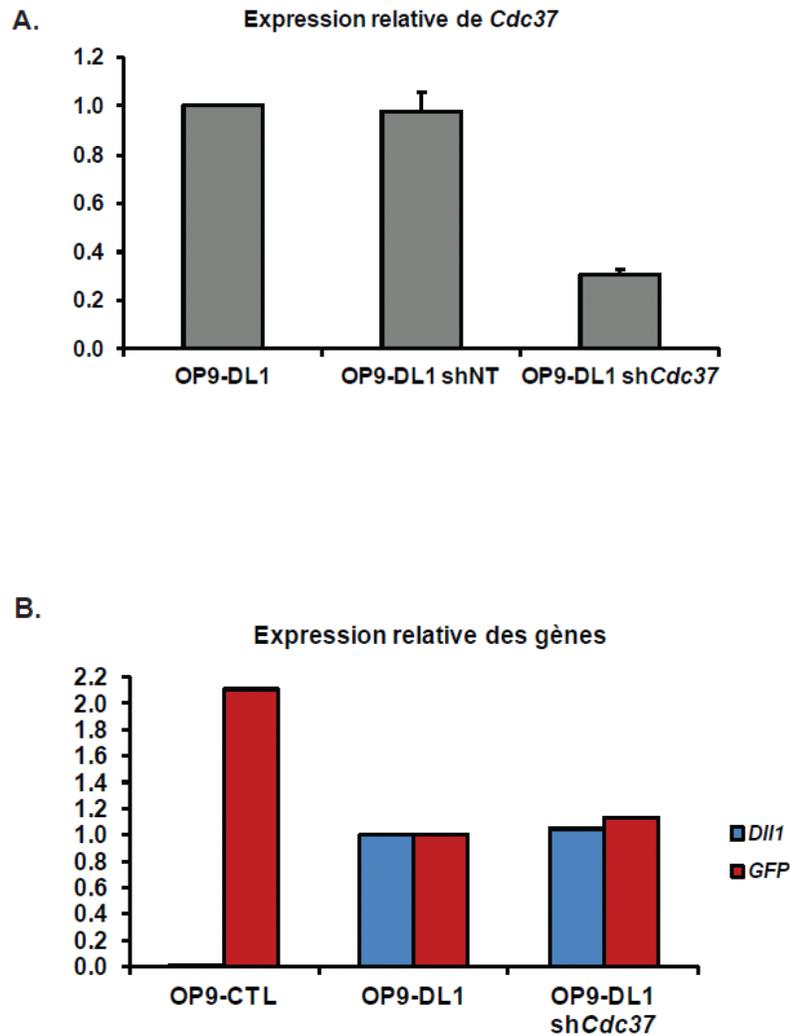
**Figure 19** : Effet de la déplétion de *Cdc37* sur la translocation du NICD au noyau des cellules HeLa.

A. Images de fluorescence montrant la distribution du signal NICD en rouge dans les cellules HeLa (bouts de flèches blancs) en co-culture avec des cellules contrôles ou OP9-DL1 sh*Cdc37*. B.

Quantification de l'IFM du signal NICD à l'intérieur et à l'extérieur du noyau des cellules HeLa dans les différentes conditions. Les données proviennent de 3 expériences distinctes et représentent la moyenne et la SEM. N=20 cellules ont été analysées par condition.

#### **4.2.2. Effet de la déplétion de *Cdc37* sur les niveaux d'expression de *Dll1* par qPCR**

Par la suite, nous avons évalué par qPCR l'effet de la déplétion de *Cdc37* sur l'expression de l'ARNm de *Dll1*, en utilisant les cellules OP9-CTL et OP9-DL1 comme contrôles. Nous avons d'abord commencé par valider l'efficacité de réduction de l'expression du gène *Cdc37* dans la lignée stable sh*Cdc37* (Figure 20A). Ensuite, nous avons mesuré les niveaux d'expression de *Dll1* et de *GFP* pour voir s'ils sont affectés par la perte de fonction de *Cdc37*, ce qui suggérerait que *Cdc37* régule la transcription des gènes dans la lignée OP9 à travers le promoteur exogène MSCV. Cependant, l'expérience de qPCR a montré que ni *Dll1* ni la *GFP* ne sont affectés par la réduction de l'expression de *Cdc37* dans les cellules OP9-DL1 (Figure 20B).

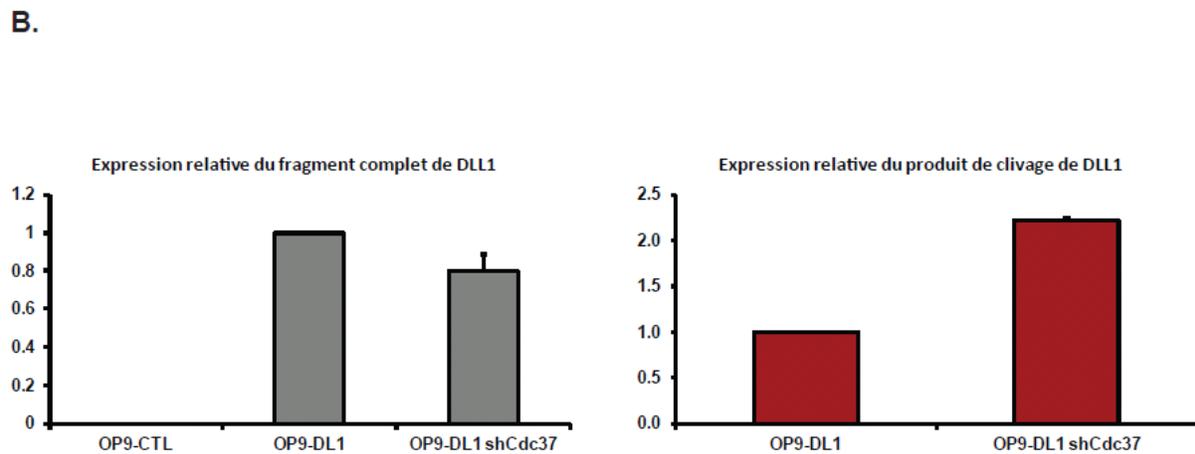
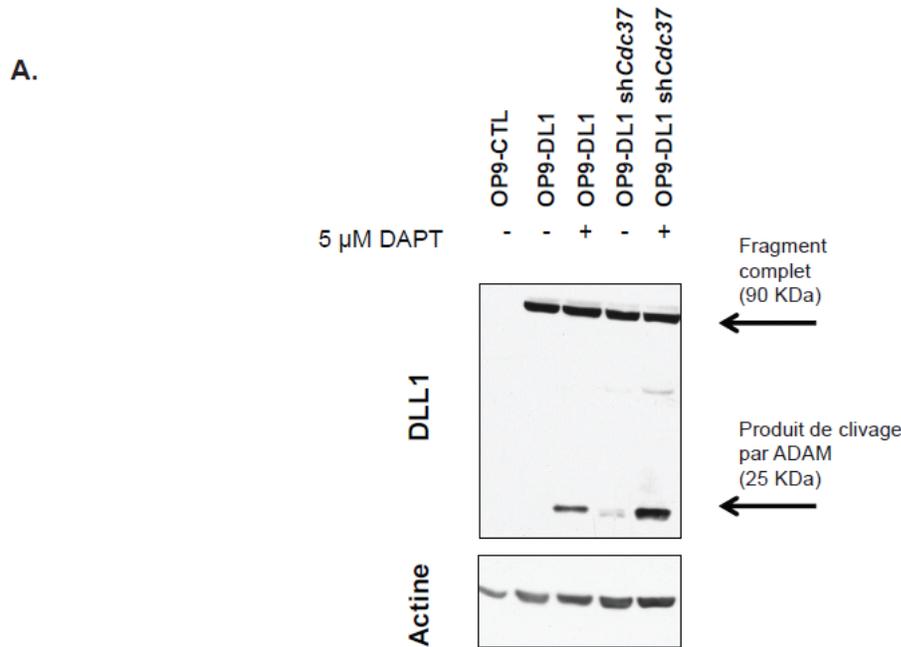


**Figure 20 :** Effet de la déplétion de *Cdc37* sur l'expression de *Cdc37* et de *Dll1*.

A. qPCR montrant que les niveaux d'expression de *Cdc37* sont efficacement réduits dans la lignée OP9-DL1 transduite de façon stable avec le shARN correspondant. Les données proviennent de 2 expériences indépendantes et représentent la moyenne et la SEM. B. qPCR montrant que les niveaux d'expression de *Dll1* et de *GFP* ne sont pas affectés suite à la déplétion stable de *Cdc37* dans les cellules OP9-DL1. Les données proviennent d'une expérience représentative et correspondent à la moyenne de 3 réplicats techniques par condition.

### **4.2.3. Effet de la déplétion de *Cdc37* sur les niveaux d'expression et la protéolyse de DLL1 par immunobuvardage de type western**

Étant donné que *Cdc37* ne semble pas affecter la transcription de *Dll1*, nous nous sommes demandé s'il ne régulerait pas plutôt les niveaux d'expression de la protéine DLL1, ce qui expliquerait les phénotypes d'inhibition de Notch suite à la déplétion de *Cdc37*. De plus, étant donné que *Cdc37* est impliqué dans la stabilité de plusieurs protéines (Farrell and Morgan 2000, Jinwal, Trotter et al. 2011, Xu and Neckers 2012), nous avons évalué l'effet de la déplétion de ce gène sur l'expression de DLL1, ainsi que sur sa stabilité, en mesurant la quantité globale de DLL1, et sa protéolyse par immunobuvardage de type western. Ainsi, nous avons utilisé l'anticorps monoclonal anti-T7 pour détecter le domaine intracellulaire de la protéine DLL1. Tel que décrit précédemment, cet anticorps est capable de reconnaître spécifiquement le fragment entier, ainsi que le fragment transmembranaire de DLL1 issu du clivage par ADAM. De plus, nous avons utilisé l'inhibiteur de la gamma-sécrétase (DAPT) pour stabiliser ce fragment transmembranaire du ligand afin de bien le visualiser. Cette expérience a démontré que la réduction de l'expression de *Cdc37* dans les cellules OP9-DL1 conduit à une légère réduction de l'expression globale de DLL1 de 20%. Cette réduction du fragment entier de DLL1 est accompagnée par une augmentation de sa protéolyse. Ainsi, la déplétion de *Cdc37* augmente de 2 fois la proportion du fragment clivé par rapport au fragment complet de DLL1 (Figure 21). Ceci suggère que *Cdc37* est impliqué dans la régulation de la stabilité du ligand DLL1 à la membrane plasmique.



**Figure 21** : Effet de la déplétion de *Cdc37* sur l'expression et le clivage de DLL1.

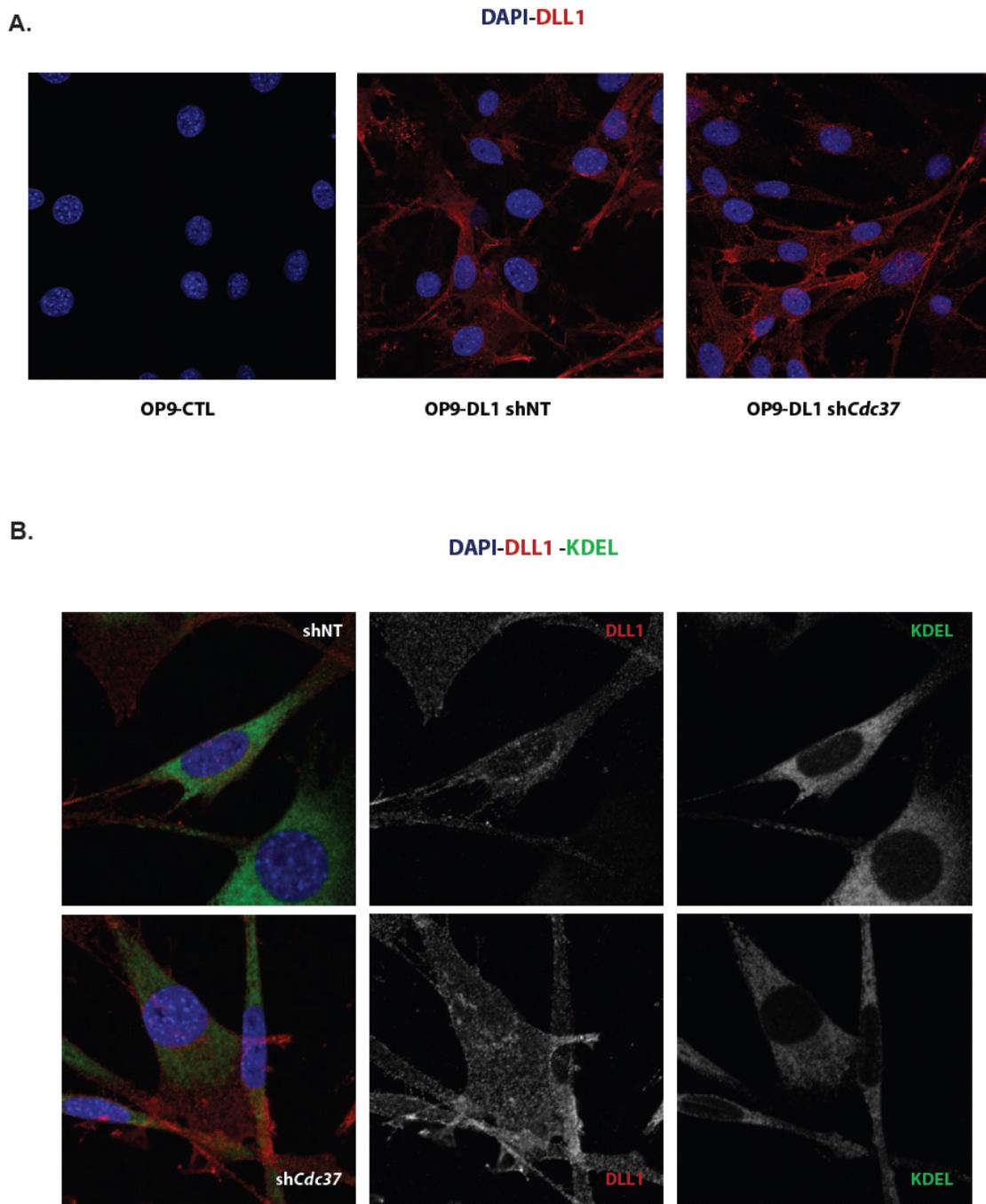
A. Expérience d'immunobuvardage représentative montrant la détection dans les cellules OP9-DL1 du fragment complet, ainsi que du fragment transmembranaire clivé de DLL1. B. Graphique de gauche:

Quantification de l'expression relative du fragment entier de DLL1 dans chaque condition, en normalisant à l'intensité de la bande d'actine correspondante. Graphique de droite: Quantification du ratio du fragment clivé par rapport au fragment complet de DLL1 dans chaque condition. Les données proviennent de 2 expériences indépendantes et représentent la moyenne et la SEM. Toutes les valeurs ont été calculées par rapport aux cellules OP9-DL1 non transduites.

#### **4.2.4. Effet de la déplétion de *Cdc37* sur la localisation sub-cellulaire de DLL1 par immunofluorescence**

Compte tenu de l'effet léger de *Cdc37* sur les niveaux d'expression globale de DLL1, nous nous sommes demandé si *Cdc37* ne jouerait pas plutôt un rôle dans la distribution sub-cellulaire du ligand afin d'affecter sa fonction de signalisation. Pour cela, nous avons effectué un marquage par immunofluorescence des cellules OP9-DL1 en utilisant l'anticorps anti-T7 qui reconnaît le domaine intracellulaire du ligand. Cette expérience a montré que la distribution globale de DLL1 dans les cellules OP9-DL1 ne semble pas affectée par la déplétion de *Cdc37*. Ainsi DLL1 est détectée de façon similaire dans des vésicules intracellulaires et à la membrane plasmique dans les deux conditions: shNT, et sh*Cdc37*; suggérant un cycle de trafic normal de DLL1 par endocytose dans les deux cas (Figure 22A).

D'autre part, étant donné que CDC37 est connue comme étant une protéine résidente du RE, où elle joue un rôle co-translationnel dans le repliement des protéines (Calderwood 2015), nous avons effectué un co-marquage de DLL1 avec le marqueur KDEL afin de vérifier si le ligand ne serait pas piégé au RE suite à un défaut de repliement dû à la déplétion de *Cdc37*. Cependant, encore une fois, cet essai ne nous a pas permis de distinguer une différence nette entre les deux conditions: shNT, et sh*Cdc37*; et nous avons été incapables de détecter DLL1 au RE dans les deux cas (Figure 22B). Donc en gros, nos données suggèrent que *Cdc37* ne semble pas contrôler le trafic et la localisation de DLL1 dans les cellules OP9-DL1, ni sa maturation au niveau du RE.



**Figure 22** : Effet de la déplétion de *Cdc37* sur la localisation sub-cellulaire de DLL1.

A. Images représentatives de la distribution de DLL1 (en rouge) dans les cellules contrôles et les cellules OP9-DL1 sh*Cdc37*. B. Images de fluorescence représentatives montrant que DLL1 (en rouge) ne co-localise pas avec le marqueur KDEL du RE (en vert) dans les cellules OP9-DL1 shNT et sh*Cdc37*.

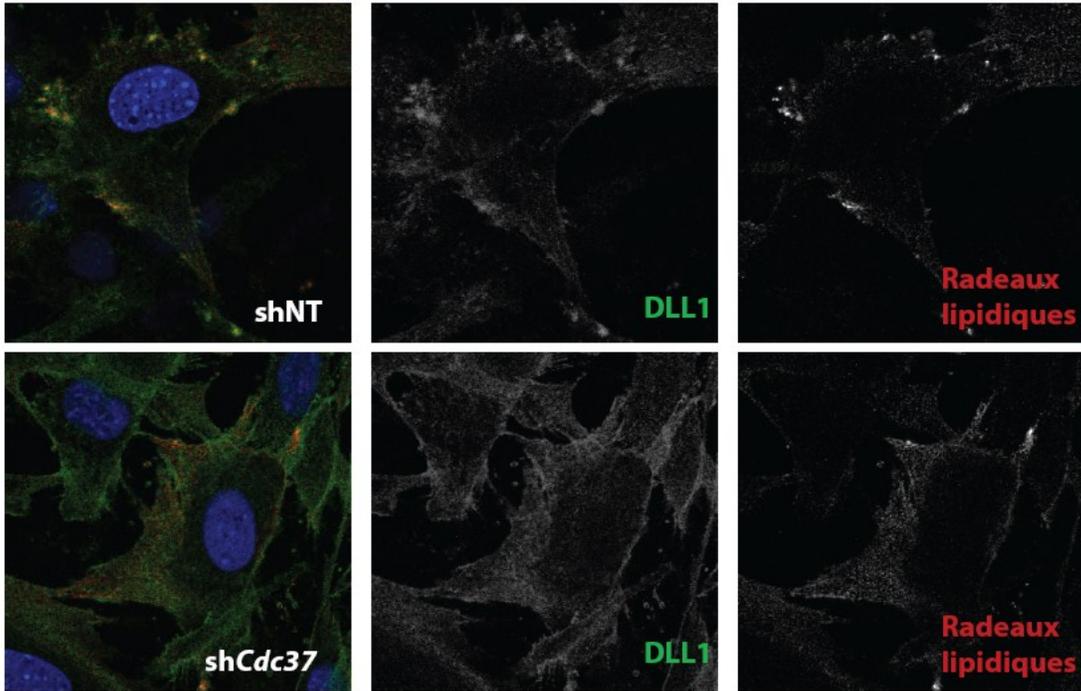
#### **4.2.5. Effet de la déplétion de *Cdc37* sur la distribution de DLL1 dans des microdomaines membranaires: les « radeaux lipidiques » par immunofluorescence**

Finalement, nous avons décidé d'évaluer le rôle de *Cdc37* dans la localisation de DLL1 aux « radeaux lipidiques » de la membrane plasmique; ce qui est nécessaire pour l'activité de signalisation du ligand. Nous avons donc effectué un co-marquage de DLL1 et des « radeaux lipidiques » dans les cellules OP9-DL1, afin de les visualiser par microscopie à fluorescence. Nous avons ainsi trouvé que la perte de fonction de *Cdc37* réduit considérablement la localisation de DLL1 à ces microdomaines membranaires dans la lignée OP9-DL1 sh*Cdc37*, par comparaison à la lignée OP9-DL1 shNT (Figure 23).

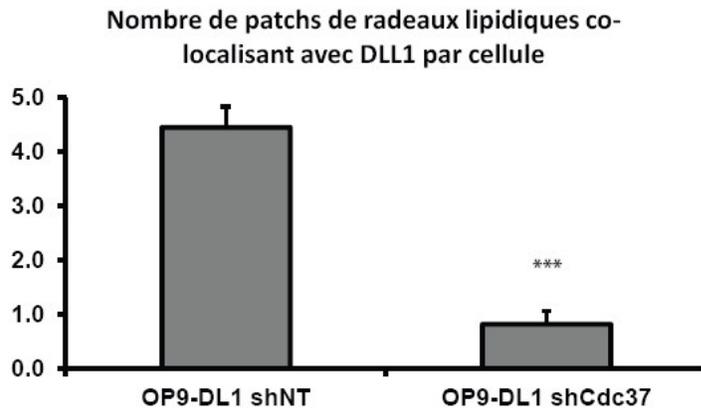
Un fractionnement membranaire des cellules OP9-DL1 et une mesure des niveaux de DLL1 par immunobuvardage de type western dans les fractions membranaires solubles (contenant la tubuline $\beta$  par exemple) et insolubles (contenant le ganglioside GM1 par exemple) serait certainement nécessaire afin de confirmer l'effet de *Cdc37* sur la distribution de DLL1 dans les « radeaux lipidiques » de la membrane.

A.

DAPI - DLL1 - Radeaux lipidiques



B.



**Figure 23** : Effet de la déplétion de *Cdc37* sur la localisation de DLL1 aux « radeaux lipidiques ». A. Images de fluorescence représentatives montrant que DLL1 (en vert) co-localise parfaitement avec les patches de « radeaux lipidiques » (en rouge) à la membrane plasmique des cellules OP9-DL1 shNT, mais non des cellules OP9-DL1 sh*Cdc37*. B. Quantification du nombre moyen de radeaux lipidiques co-localisant avec DLL1 par cellule. Les données proviennent de 2 expériences distinctes et représentent la moyenne et la SEM. 20<N<25 cellules ont été analysées par condition.

## 4.2.6. Conclusions et perspectives

En conclusion, nos expériences de caractérisation préliminaire de *Cdc37* dans les cellules OP9-DL1 ont confirmé le rôle de ce nouveau régulateur des ligands DSL dans la trans-activation de Notch par translocation du NICD au noyau des cellules réceptrices. En outre, elles ont démontré que la perte de fonction de *Cdc37* n'affecte pas les niveaux d'expression de l'ARNm de *Dll1*, mais qu'elle réduit par contre les niveaux d'expression globale de la protéine DLL1 de l'ordre de 20%, et qu'elle augmente sa protéolyse par les enzymes ADAM à la surface cellulaire. Ces données suggèrent donc que *Cdc37* joue un rôle dans la stabilité de DLL1 au niveau de la membrane plasmique. Dans ce contexte, des expériences de mesure de la demi-vie de DLL1 dans des cellules OP9-DL1 shNT et sh*Cdc37*, suivant le traitement au cycloheximide, seraient requises pour évaluer l'effet de *Cdc37* sur la stabilité de DLL1. D'autre part, nos résultats suggèrent que la déplétion de *Cdc37* ne semble pas affecter la maturation de DLL1 au niveau du RE, contrairement à notre hypothèse de départ basée sur la fonction moléculaire bien connue de *Cdc37*. Ainsi, nous avons démontré que la déplétion de *Cdc37* dans les cellules OP9-DL1 n'affecte pas le trafic de DLL1 ni sa distribution sub-cellulaire, et qu'elle n'entraîne pas son accumulation au RE. Par contre, sh*Cdc37* entraînerait un défaut de localisation de DLL1 aux « radeaux lipidiques » de la membrane plasmique.

Il est intéressant de noter que la déplétion de *Mib1* dans les cellules OP9-DL1, tout comme celle de *Cdc37*, entraîne une augmentation des niveaux de la protéolyse de DLL1 d'après les résultats de nos essais d'immunobuvardage. De plus, la protéine DLL1 dans nos cellules OP9-DL1 sh*Cdc37*, ainsi qu'une protéine DLL1 défective qui ne peut pas être ubiquitinée suite à la mutation de toutes ses lysines intracellulaires (Heuss, Ndiaye-Lobry et al. 2008), présentent toutes les deux un défaut de localisation aux « radeaux lipidiques ». Par la suite, il serait intéressant de savoir si la déplétion de *Cdc37* n'affecterait pas le statut d'ubiquitination de DLL1, et si elle n'aurait pas d'effet sur le repliement ou la stabilité de MIB1 tel que démontré pour d'autres « protéines clientes » du complexe HSP90/CDC37.

Finalement, tout comme pour TMEM128, l'analyse protéomique des interacteurs de CDC37 dans nos cellules permettrait de savoir si cette protéine interagit directement avec DLL1 ou indirectement via un co-facteur, et d'identifier par la suite les sites qui sont

responsables de cette interaction. Ceci permettrait à plus long terme de mettre au point des essais chimiques à portée thérapeutique, afin d'identifier de petites molécules capables de bloquer l'action de CDC37 sur DLL1, en perturbant par exemple l'interaction fonctionnelle entre CDC37 et son/ses partenaire(s).

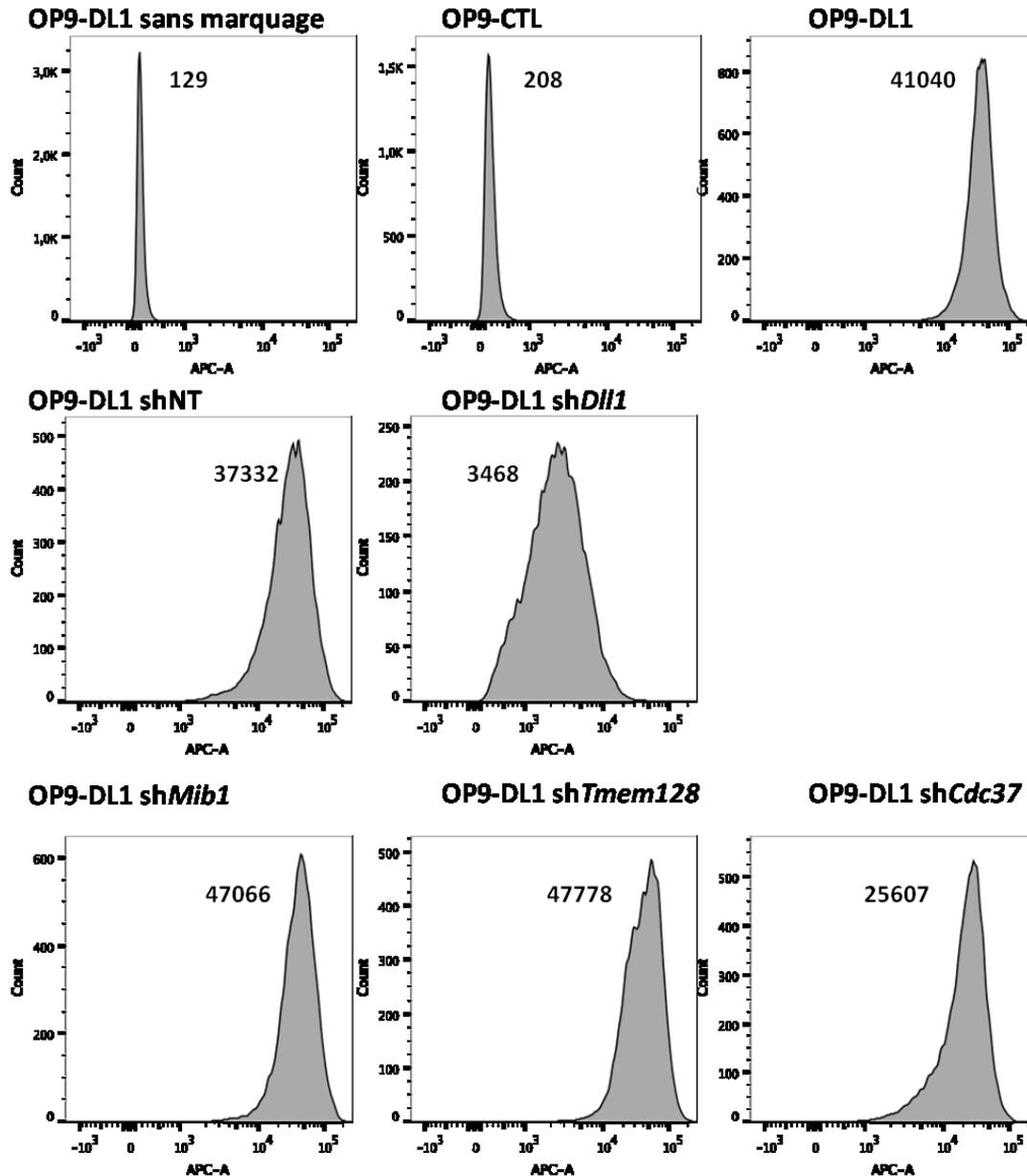
### **4.3. Rôle des nouveaux régulateurs des ligands dans l'interaction entre les cellules émettrices et les cellules réceptrices**

La signalisation Notch joue un rôle important dans l'interaction et la communication inter-cellulaire. De plus, il a été démontré que le récepteur NOTCH et le ligand DLL1 peuvent agir en soi comme molécules membranaires d'adhésion pour favoriser l'adhérence des mastocytes de souris au stroma OP9-DL1 *in vitro*. Cette adhésion serait la conséquence directe de l'interaction entre ces deux types de cellules, et elle est inhibée par l'ajout d'anticorps bloquants contre le ligand ou le récepteur (Murata, Okuyama et al. 2010). Nous nous sommes alors demandé si un mécanisme similaire d'adhésion ne serait pas mis en place entre les thymocytes DN de souris, qui sont des cellules en suspension, et le stroma de cellules OP9-DL1 afin de favoriser l'interaction cellulaire et l'activation de la signalisation Notch au cours de nos essais fonctionnels. Ce processus d'adhésion étant contrôlé par les molécules de ligand DLL1 dans les cellules OP9-DL1, nous avons alors décidé d'évaluer la fonction de certains régulateurs clés des ligands au cours de l'interaction entre les cellules émettrices et les cellules réceptrices.

#### **4.3.1. Effet de la déplétion des régulateurs sur les niveaux de surface de DLL1 par cytométrie en flux**

Vu que les niveaux membranaires de DLL1 semblent très critiques pour moduler l'adhésion cellulaire, nous avons d'abord commencé par évaluer la quantité de DLL1 à la surface dans les différentes lignées shARNs que nous avons générées contre nos régulateurs clés, ainsi que dans les lignées OP9-CTL, OP9-DL1, et OP9-DL1 shNT comme contrôles.

Pour cela, nous avons effectué un marquage des cellules OP9, en conditions non-perméabilisantes, avec un anticorps monoclonal dirigé contre le domaine extracellulaire de DLL1 et couplé au fluorochrome APC (Allophycocyanine). Ensuite, nous avons analysé les niveaux de surface de DLL1 correspondants par cytométrie en flux en mesurant l'intensité moyenne d'APC dans chaque condition. Nous avons utilisé la déplétion par shARN de *Dll1* dans les cellules OP9-DL1, comme contrôle positif pour la réduction de l'expression du ligand à la surface, afin de confirmer la sensibilité de détection de notre essai. Effectivement, nous avons pu enregistrer une baisse des niveaux membranaires de DLL1 de 92% dans la lignée sh*Dll1* comparativement à la lignée OP9-DL1 non transduite. Mise à part la déplétion de *Dll1* en soi, nous avons trouvé que seule la déplétion de *Cdc37* est capable de réduire de 38% les niveaux de surface de DLL1 comparativement aux cellules OP9-DL1 non transduites. Ceci est en accord avec l'augmentation de la protéolyse de DLL1 à la surface suite à la déplétion de *Cdc37* dans nos expériences d'immunobuvardage de type western. En contrepartie, la déplétion de *Tmem128* ou de *Mib1* ne semble pas affecter significativement les niveaux de DLL1 à la surface; où nous avons détecté une légère augmentation de l'intensité moyenne d'APC dans ces deux conditions par rapport aux cellules OP9-DL1 non transduites (Figure 24). Étant donné que *Mib1* est un régulateur clé de l'endocytose de DLL1 suite à son ubiquitination, nous nous serions attendus à ce que la déplétion de *Mib1* augmente de façon considérable les niveaux de surface de DLL1 en inhibant son internalisation. Cependant nous avons uniquement enregistré une augmentation subtile de la quantité de DLL1 à la surface dans la lignée sh*Mib1*, conformément à la légère augmentation de l'expression du fragment entier de DLL1 dans cette lignée d'après nos expériences d'immunobuvardage. Ceci suggère que dans nos cellules, l'ubiquitination ne serait pas requise pour l'endocytose constitutive de DLL1, mais plutôt pour les événements d'internalisation spécifiques à l'activation de la signalisation, tel que décrit précédemment (Heuss, Ndiaye-Lobry et al. 2008). Ainsi *Mib1* serait nécessaire pour l'internalisation d'une sous-population spécifique du ligand qui est responsable de son activité de signalisation, et qui est possiblement au-dessous de la limite de détection de notre essai de cytométrie.

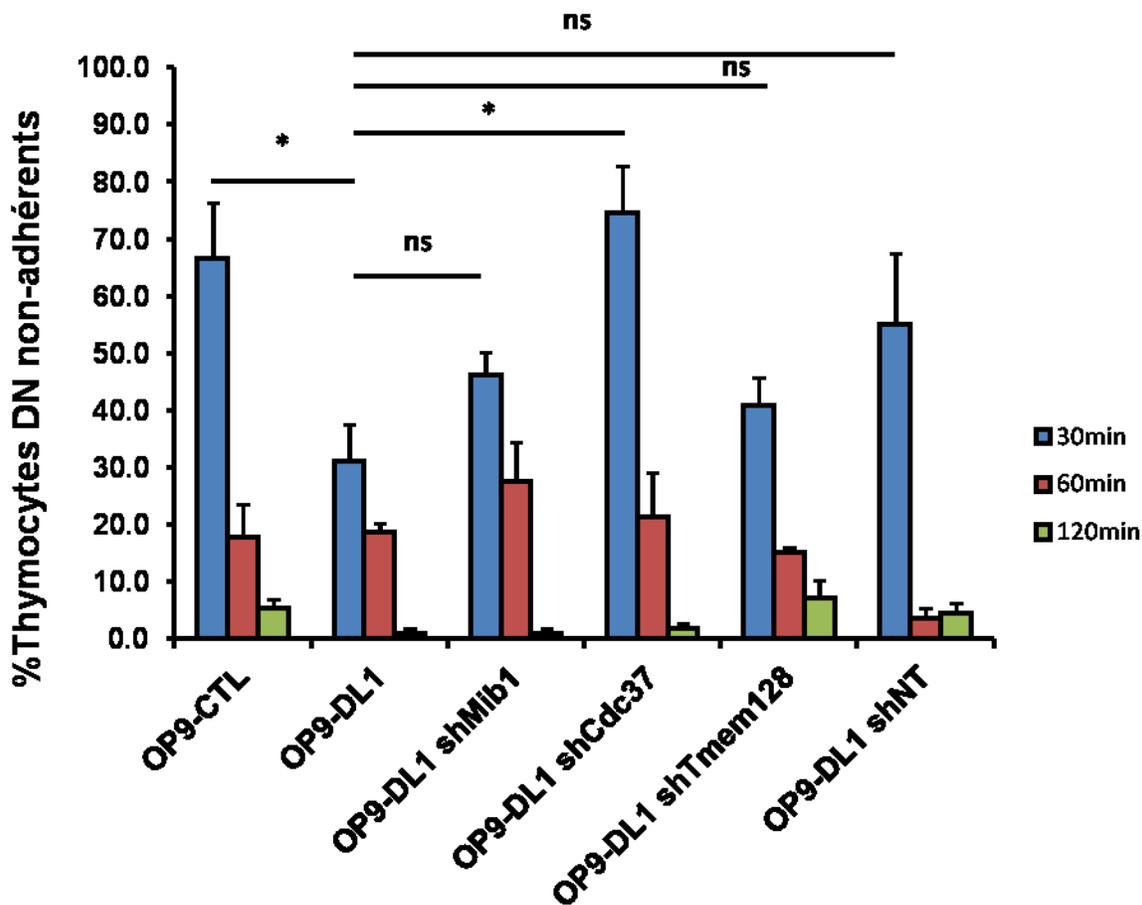


**Figure 24** : Effet de la déplétion de régulateurs clés des ligands sur les niveaux de DLL1 à la surface cellulaire.

Profils de cytométrie en flux représentatifs montrant la distribution de l'intensité de l'APC-DLL1 dans chaque population cellulaire. Les valeurs indiquées en gros sur les graphiques représentent l'intensité moyenne de fluorescence de l'APC dans chaque condition. Seules les lignées sh*Cdc37* et sh*Dl11* présentent une réduction des niveaux de surface de DLL1 par rapport à la lignée OP9-DL1 non transduite.

### 4.3.2. Effet de la déplétion des régulateurs sur l'adhésion des thymocytes DN sur le stroma de cellules OP9

Par la suite, nous avons mesuré l'adhérence des thymocytes DN sur le stroma de cellules OP9-DL1 correspondant aux différentes lignées shARNs que nous avons générées contre nos régulateurs clés, ainsi que sur des cellules OP9-CTL, OP9-DL1, et OP9-DL1 shNT comme contrôles. Ainsi, les thymocytes DN isolés de souris WT ont été rajoutés aux monocouches confluentes de cellules OP9, et incubés avec ces dernières à 37°C pendant des intervalles de temps définis. Après chaque intervalle, les thymocytes DN non-adhérents ont été récupérés par agitation vigoureuse des plaques de culture sur un agitateur de plaques, et les DN non-adhérents ont été comptés pour chaque condition en utilisant un hémacytomètre. Pour chaque laps de temps, le pourcentage de DN non-adhérents a été calculé relativement aux thymocytes initialement rajoutés aux puits (150 000/puits). Cette quantification nous a permis de conclure qu'après 30 minutes de co-culture, seule la déplétion de *Cdc37* entraîne un défaut d'adhésion significatif des thymocytes DN sur les cellules OP9-DL1 de façon similaire aux cellules OP9-CTL qui n'expriment pas le ligand DLL1. Ceci est en accord avec les données de cytométrie en flux qui ont montré une réduction de l'expression de DLL1 uniquement à la surface de la lignée sh*Cdc37*. Par contre, nous avons trouvé que la déplétion de *Mib1* ou de *Tmem128* dans les cellules OP9-DL1 n'affecte pas de façon significative l'adhésion des thymocytes DN sur le stroma au bout de 30 minutes de co-culture. De même, ce résultat est en accord avec les données d'expression de DLL1 à la surface des lignées sh*Mib1* et sh *Tmem128*. Finalement, nous avons trouvé que les différences d'adhésion entre les différentes lignées OP9-DL1 s'observent uniquement à l'intervalle de temps de 30 minutes. Au-delà de cette période de temps, presque tous les thymocytes sont déjà adhérents au stroma de cellules OP9, et nous ne pouvons plus discerner des différences entre les diverses conditions (Figure 25).



**Figure 25 :** Effet de la déplétion de régulateurs clés des ligands sur l'adhésion des thymocytes DN sur le stroma OP9-DL1.

Expérience d'adhésion représentative montrant le pourcentage des thymocytes DN non-adhérents estimé à différents moments suivant le rajout des cellules DN au stroma de cellules OP9. Seule la lignée *shCdc37* présente une réduction d'adhérence par rapport à la lignée OP9-DL1 non transduite au bout de 30 minutes de co-culture. Les données représentent les moyennes de 3 réplicats par condition par laps de temps, et les barres d'erreur représentent les SEM.

### 4.3.3. Conclusions et Perspectives

En conclusion, notre expérience d'adhérence suggère que l'adhésion des thymocytes DN sur le stroma de cellules OP9 s'effectue très rapidement suivant la co-culture, et qu'elle est facilitée par la présence de DLL1 à la surface cellulaire des OP9. Ceci implique que les

défauts de la signalisation Notch que nous avons observés suite à la déplétion des régulateurs des ligands dans nos cribles physio-pathologiques sont associés à des défauts de la prolifération et non de l'adhésion cellulaire des thymocytes DN. En effet, les essais fonctionnels correspondants à ces cribles ont été réalisés 4 jours après co-culture, au moment où tous les thymocytes présents dans les puits sont déjà adhérents au stroma.

Parmi les trois régulateurs des ligands que nous avons testés dans l'expérience d'adhérence cellulaire, seul *Cdc37* semble impliqué dans le processus d'interaction entre les cellules émettrices et les cellules réceptrices. Ce résultat corrèle avec le fait que la déplétion de *Cdc37* entraîne une réduction des niveaux membranaires de DLL1 dans la lignée OP9-DL1, contrairement à la déplétion de *Mib1* ou de *Tmem128*. Par ailleurs, il serait intéressant de vérifier si ce processus d'interaction n'implique pas d'autres protéines et récepteurs d'adhésion dans les cellules OP9-DL1; tels que les cadhérines par exemple. Par la suite, nous pourrions comparer les niveaux d'expression de ces régulateurs d'adhésion connus dans les lignées OP9-DL1 shNT et sh*Cdc37*, afin de voir si *Cdc37* affecterait leur expression ou leur stabilité. De même, il serait pertinent de mesurer l'expression de protéines à domaines PDZ, comme MAGI-1 et Dlg1, dont l'interaction avec le domaine PDZ de la région intracellulaire du ligand DLL1 est impliquée dans le processus d'adhésion cellulaire, tel que décrit dans l'introduction.

## Chapitre 5

## 5. Discussion

### 5.1. Utilisation des essais luciférase comme outil fiable pour identifier de nouveaux modulateurs de la voie Notch

Au fil des années, les essais cellulaires basés sur la luminescence ont démontré leur valeur comme outil très puissant pour tester le statut d'activation des voies de signalisation. Ceci est dû en particulier à leur degré élevé de sensibilité, et à la large plage dynamique qu'ils présentent dans le contexte d'études de criblage à haut débit. Nous avons fait usage de cet outil pour rechercher de nouveaux régulateurs du ligand Delta-like1 dans le cadre de la voie de signalisation Notch. En effet, cette voie est anormalement activée dans de nombreux cancers, et les mécanismes de régulation de ses ligands canoniques ne sont pas entièrement élucidés.

La puissance de notre approche réside dans l'optimisation d'un système de co-culture robuste qui nous a permis de cibler spécifiquement les gènes dans la lignée émettrice du signal exprimant le ligand DLL1, et d'évaluer l'effet de leur déplétion sur la trans-activation de Notch dans la lignée réceptrice du signal qui exprime un rapporteur luciférase de l'activité transcriptionnelle du récepteur. Ainsi, nous avons effectué le premier crible d'ARNi pan-génomique ayant pour objectif d'identifier spécifiquement des régulateurs des ligands DSL de Notch au niveau de la cellule émettrice du signal. Ce crible primaire, ainsi que les cribles de confirmation subséquents, incluant l'essai de validation dans une lignée OP9 exprimant un autre ligand DSL (DLL4), ont pu révéler de nouveaux acteurs de la voie Notch qui régulent l'activité des ligands. En particulier, nous avons identifié des gènes codant pour des inhibiteurs de protéases, des facteurs de transcription, des composants de la machinerie d'ubiquitination, ainsi que des gènes à fonction préalablement inconnue tels que *Tmem128* (Figure 6B page 75).

Étonnamment, à l'exception de la chaîne lourde de la clathrine, d'autres composants de la machinerie d'endocytose, ayant été auparavant impliqués dans la régulation du trafic de DLL1 n'ont pas pu dépasser le seuil de positivité que nous avons établi pour le crible primaire. Néanmoins, leur déplétion a entraîné une inhibition modérée de l'activité du rapporteur luciférase de Notch dans ce crible. Ce faible phénotype pourrait être attribué à la

redondance des gènes chez les mammifères, vu que notre modèle expérimental a consisté en une déplétion individuelle plutôt qu'en une co-déplétion simultanée des membres d'une même famille.

Par contre, notre crible a révélé plusieurs gènes impliqués dans la régulation du processus de protéolyse ubiquitine-dépendante, y compris de nombreuses enzymes E2 de conjugaison d'ubiquitine (*Ube2v2*, *Ube2i*, *Ube2g2*), des gènes codant pour des protéines à domaines RING « Really Interesting New Gene » pouvant agir comme de nouvelles enzymes E3 ubiquitine ligases putatives, et deux enzymes à activité déubiquitinase (*Usp7* and *Usp12*). En effet, les processus d'ubiquitination/déubiquitination du ligand et du récepteur revêtent une importance particulière dans la régulation de l'activité de signalisation de la voie Notch, tel que décrit dans l'introduction (Le Bras, Loyer et al. 2011, Weinmaster and Fischer 2011, Moretti and Brou 2013). Cependant, alors que les deux enzymes E3 ubiquitine ligases, Mib et Neur, qui agissent sur les ligands et régulent leur activité sont amplement caractérisées, l'identité des enzymes E2 de conjugaison d'ubiquitine et des enzymes déubiquitinases (DUBs) qui contrôlent l'activité de signalisation des ligands DSL de Notch demeure presque entièrement inconnue. Un crible par ARNi de gènes candidats chez la *Drosophila*, ciblant toutes les DUBs annotées dans le génome de la mouche a révélé au moins quatre DUBs régulant la signalisation Notch *in vivo*. Celles-ci comprennent les homologues de BAP1 « BRCA1 Associated Protein-1 », USP10, et eIF3F et H des vertébrés (Zhang, Liu et al. 2012). Conformément à cela, un crible pan-génomique dans le poisson zébré avait précédemment révélé trois DUBs comme régulateurs de la voie de signalisation Notch: otud7b « OTU deubiquitinase 7B », uch13 « ubiquitin carboxyl-terminal esterase L3 », et bap1 (Tse, Eisenhaber et al. 2009). Cependant, dans les deux cribles mentionnés ci-dessus, il n'a pas été déterminé si les DUBs identifiées agissent sur le récepteur Notch ou sur les ligands DSL. Étonnamment, aucune de ces DUBs n'a dépassé le seuil initial de positivité établi dans notre crible primaire à essai luciférase, bien que la réduction de leur expression ait entraîné une inhibition modérée du rapporteur luciférase de Notch. Ce résultat suggère que leur fonction serait plus importante dans la cellule réceptrice du signal, exprimant le récepteur Notch. À date, deux DUBs ont été démontrées comme agissant sur le récepteur Notch en soi. Il s'agit d'eIF3F et USP12 qui se comportent respectivement comme régulateurs positif et négatif de la

signalisation Notch (Moretti, Chastagner et al. 2010, Moretti, Chastagner et al. 2012). D'autre part, uniquement une DUB a été rapportée comme régulateur positif du ligand Delta de Notch. Il s'agit de l'enzyme de *Drosophila* Faf « Fat facets » qui constitue l'homologue d'USP9 chez les vertébrés (Cadavid, Ginzl et al. 2000, Chen and Fischer 2000, Chen, Zhang et al. 2002, Overstreet, Fitch et al. 2004). La déplétion de ses homologues les plus proches chez la souris; les gènes *Usp9x* et *Usp9y* a conduit respectivement à 22% et 27% d'inhibition de l'activité du rapporteur luciférase de Notch dans notre crible primaire. En gros, notre étude a révélé pour la première fois de nouveaux composants de la machinerie d'ubiquitination qui agissent spécifiquement sur les ligands, et qui étaient auparavant entièrement inconnus. Cependant, l'effet de ces régulateurs sur l'ubiquitination et la stabilité de DLL1 requiert encore une confirmation expérimentale.

Il est intéressant de noter que certains composants de la machinerie d'ubiquitination identifiés dans notre crible sont impliqués dans la voie de dégradation ERAD « Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation ». Celle-ci désigne le mécanisme par lequel les protéines mal repliées au niveau du RE sont ubiquitinées pour être dégradées par le protéasome. Ainsi, les protéines mal repliées interagissent avec des chaperonnes luminales, s'associent à la machinerie d'ubiquitination ERAD, et elles sont finalement retransloquées au cytosol pour être dégradées par le protéasome. Dans ce contexte, l'enzyme E2 de conjugaison d'ubiquitine UBE2G2 ou UBC7 qui a été identifiée dans le crible consiste en une protéine cytosolique impliquée dans la voie ERAD (Kim, Zavacki et al. 2003), et l'enzyme E3 ubiquitine ligase AMFR « Autocrine Motility Factor Receptor », également identifiée dans le crible, est une protéine résidente du RE et impliquée dans le processus d'ERAD (Fang, Ferrone et al. 2001). Cette observation suggère que le repliement des ligands DSL et leur maturation au cours de la biosynthèse sont finement régulés et affectent leur activité de signalisation. Ceci est particulièrement important étant donné que des protéines du RE telles que TMEM128 et CDC37 comptent parmi les régulateurs les plus puissants qui ont été révélés par notre crible. Conformément à cela, CDC37 est impliqué dans le processus d'UPR « Unfolded Protein Response » qui permet à la cellule de s'adapter au stress du RE associé à la toxicité des protéines mal repliées (Ota and Wang 2012).

Remarquablement, notre crible nous a aussi permis d'identifier des enzymes impliquées dans le processus de la sumoylation comme régulateurs positifs des ligands DSL de Notch. Il s'agit de l'enzyme E2 de conjugaison d'ubiquitine UBE2I ou UBC9, et de l'enzyme E3 ubiquitine ligase PIAS1 « Protein Inhibitor of Activated STAT 1 ». La sumoylation est une modification post-traductionnelle similaire à l'ubiquitination, impliquant une cascade d'enzymes et consistant en une liaison covalente d'une ou de plusieurs protéines SUMO sur une lysine acceptrice de la protéine cible. Il existe 4 protéines SUMO chez les mammifères qui ont été caractérisées à date (SUMO1, 2, 3, et 4). La réduction de l'expression de *Sumo2* dans notre crible primaire a entraîné une inhibition de l'activité du rapporteur luciférase de Notch de 28%. Le processus de sumoylation est impliqué dans la régulation de plusieurs propriétés des protéines cibles, y compris le trafic intracellulaire, l'activité transcriptionnelle, et les interactions avec l'ADN et avec d'autres protéines. Alors qu'il existe déjà des évidences de modification du régulateur de Notch MAML1 par sumoylation (Lindberg, Popko-Scibor et al. 2010), notre étude rapporte pour la première fois un lien entre les ligands Delta-like et la sumoylation. Ainsi, il n'existe aucune évidence dans la littérature d'une modification directe de Delta par sumoylation, bien qu'il ait été démontré que des composants de la voie de sumoylation chez *C. elegans*, incluant UBC9, répriment l'expression de l'homologue de Delta (*lag-2*) au niveau transcriptionnel (Poulin, Dong et al. 2005). Nous ignorons encore si les ligands DSL en soi sont modifiés par sumoylation dans nos cellules OP9, ou bien s'il s'agit d'un mécanisme indirect où des régulateurs de DLL1/4 sont sumoylés.

En ce qui concerne les autres types de modifications post-traductionnelles des ligands DSL préalablement impliquées dans la régulation de leur activité, notre crible a confirmé les résultats précédents suggérant que la glycosylation de DLL1 est dispensable pour sa fonction de signalisation (Muller, Rana et al. 2014). Ainsi, la déplétion de l'enzyme d'O-fucosylation *Pofut* dans le crible primaire a conduit à une inhibition minimale de 7% de l'activité de notre rapporteur luciférase de Notch. D'autre part, alors qu'il a été démontré récemment que la phosphorylation de DLL1 par un processus impliquant la kinase PKB (ou AKT) est essentielle à son activité de signalisation *in vitro* (Braune, Schuster-Gossler et al. 2014), la déplétion d'*Akt1* a conduit à 16%, et celle d'*Akt3* a conduit à 32% d'inhibition du rapporteur luciférase de Notch dans notre crible primaire. De nouveau, ces phénotypes modérés peuvent être dûs à une

redondance dans la fonction des membres de la famille Akt. Dans les deux cas, l'inhibition étant inférieure au seuil de positivité que nous avons établi pour l'essai primaire, ces deux gènes n'ont pas été retenus pour les étapes subséquentes de validation du crible. Par contre, la protéine kinase PIK3R5 « Phosphoinositide-3-Kinase, Regulatory Subunit 5 » est l'une des kinases les plus remarquables qui ont été révélées par notre criblage. Sa déplétion a conduit à une inhibition du rapporteur luciférase de Notch de l'ordre de 43% dans le crible primaire, et cette enzyme a survécu à tous les cribles de validation ultérieurs. Il serait intéressant d'évaluer le statut de phosphorylation de DLL1 ou DLL4 suite à la déplétion de cette kinase dans les cellules OP9, et de démontrer également par essai kinase *in vitro* que PIK3R5 est capable de phosphoryler les ligands DSL de Notch.

Dans ce contexte, il est intéressant de noter que CDC37, qui constitue l'un des régulateurs les plus robustes des ligands DSL que nous avons identifiés dans ce crible, est connu comme interagissant principalement avec des protéines kinases afin de moduler leur association avec la chaperonne HSP90 pour assurer leur repliement et leur maturation (Taipale, Krykbaeva et al. 2012). La déplétion de *Cdc37* a abouti à 55% d'inhibition de Notch dans le crible primaire basé sur l'essai luciférase avec les cellules OP9-DL1, et à 41% d'inhibition de Notch dans le crible secondaire basé sur l'essai luciférase avec la lignée OP9-DL4. Il est tentant de spéculer que CDC37 interagit avec la kinase PIK3R5 nouvellement identifiée dans le crible afin de réguler sa maturation, et que PIK3R5 à son tour régule la fonction des ligands DLL1 et DLL4 en contrôlant leur phosphorylation. Évidemment, un tel mécanisme est purement spéculatif et il devrait être démontré expérimentalement, surtout qu'à date, nous n'avons trouvé aucune évidence dans la littérature d'une interaction entre CDC37 et PIK3R5. Par contre, il a été suggéré que le complexe HSP90/CDC37 est capable d'affecter la stabilité de la kinase AKT (Theodoraki, Kunjappu et al. 2007, Jinwal, Trotter et al. 2011). Ainsi, nous pourrions imaginer un mécanisme similaire de régulation d'AKT par CDC37 pour contrôler l'activité de signalisation des ligands de Notch.

D'autre part, il a été démontré que les niveaux de l'enzyme E3 ubiquitine ligase MIB1, qui est un régulateur clé des ligands DLL1 et DLL4, peuvent être modulés par les protéines kinases PAR-1 « Partitioning- defect 1 » et CDK5 « Cyclin-Dependent Kinase 5 ». Ainsi, la phosphorylation de MIB1 par la protéine de polarité cellulaire PAR-1 durant la neurogenèse

résulte en une auto-ubiquitination de MIB1 pour induire sa dégradation par le protéasome. Cette réduction des niveaux de la protéine MIB1 conduit à son tour à une réduction de l'ubiquitination de Delta et par conséquent à une réduction de la signalisation Notch, entraînant ainsi une expansion de progéniteurs qui se différencient en neurones (Ossipova, Ezan et al. 2009). De même, la kinase CDK5 qui est enrichie dans les neurones est capable de phosphoryler MIB1 afin de renforcer son activité ligase aboutissant à une réduction de ses niveaux protéiques et à une suppression des effets inhibiteurs de Mib1 sur la morphologie des neurites (Choe, Liao et al. 2007). Fait intéressant, il a été rapporté que CDC37 contrôle la stabilité de la kinase CDK5 dans les neurones (Jinwal, Trotter et al. 2011), suggérant un mécanisme par lequel CDC37 pourrait réguler la signalisation Notch en modulant les niveaux de la kinase CDK5 qui à son tour régule les niveaux de MIB1. À noter que contrairement aux attentes, les kinases PAR-1 et CDK5 n'ont pas été identifiées comme régulateurs négatifs de la signalisation Notch dans notre crible. Ainsi leur déplétion a conduit respectivement à 12% et 10% d'inhibition du rapporteur luciférase de Notch dans le crible primaire. Ceci suggérerait un mécanisme distinct de régulation des niveaux de MIB1 dans les cellules OP9 comparativement aux cellules neuronales.

Sur une note différente, l'interaction des ligands DSL avec les glycosphingolipides et avec d'autres protéines est essentielle pour leur fonction de signalisation tel que discuté dans l'introduction. Ainsi, il a été démontré récemment que l'interaction du ligand DLL1 murin avec les glycosphingolipides de la membrane est nécessaire pour son activité (Heuss, Tarantino et al. 2013). Cependant, l'inactivation de la céramide glucosyltransférase, qui est l'enzyme impliquée dans la phase initiale de synthèse des glycosphingolipides, a conduit à une inhibition modérée de 17% du rapporteur luciférase de Notch dans notre crible primaire, ce qui ne dépasse pas le seuil initial de positivité que nous avons établi.

D'autre part, le gène *Cnksr3* « *Connector enhancer of kinase suppressor of Ras- family member 3* » a été identifié comme un régulateur positif des ligands Delta-like dans notre crible. En effet, sa déplétion a entraîné une inhibition de Notch de 46% dans l'essai luciférase primaire sur les cellules OP9-DL1 et une inhibition de Notch de 52% dans l'essai luciférase secondaire sur les OP9-DL4. Fait intéressant, *Cnksr3* est aussi connu sous le nom de *Magil* qui code pour une protéine à domaine PDZ interagissant avec le domaine intracellulaire des

ligands DLL1 et DLL4 (Wright, Leslie et al. 2004, Mizuhara, Nakatani et al. 2005). L'identification de MAGI1 comme régulateur positif de l'activité des ligands dans notre étude est en accord avec son rôle dans le système nerveux central où sa liaison au domaine PDZ du ligand DLL1 stabilise le ligand à la surface cellulaire et favorise son interaction avec le récepteur pour renforcer l'activation de la signalisation Notch (Mizuhara, Nakatani et al. 2005).

De plus, de nombreux facteurs de transcription ont été validés comme régulateurs positifs de *Dll1* dans notre crible, y compris certains gènes ayant des liens précédents avec la voie Notch, mais au niveau de la cellule réceptrice. Ces derniers incluent par exemple le gène *Xrcc5* « *X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 5* » dont l'expression corrèle avec celle de *Maml1* dans les cellules rénales (Pournara, Holmlund et al. 2014), et *Prdm16* « *PR domain containing 16* » qui contrôle l'accès du facteur de transcription CSL aux promoteurs des gènes cibles de Notch chez la *Drosophile*, et dont l'expression est à son tour régulée par le gène cible de Notch *Hes* chez la souris (Kinameri, Inoue et al. 2008, Endo, Karim et al. 2012). Actuellement, nous ne disposons pas de données indiquant si ces régulateurs de la transcription que nous avons identifiés agissent directement sur l'expression de *Dll1* dans nos cellules, ou indirectement en modulant la transcription d'un régulateur clé du ligand. L'hypothèse d'un effet direct serait moins attirante étant donné que *Dll1* n'est pas exprimé sous le contrôle de son promoteur endogène dans la lignée OP9-DLL1.

Finalement, parmi les inhibiteurs de protéases identifiés dans notre étude, les membres de la famille TIMP « Tissue Inhibitor of Metalloproteinases », qui agissent sur des métalloprotéases diverses incluant les MMPs « Matrix Metalloproteinases » et les ADAMs, sont particulièrement intéressants. Alors que les TIMPs agissent de façon générale sur toutes les MMPs, ils présentent plus de spécificité à l'égard des protéases de la famille ADAM qu'ils inactivent (Murphy 2011). Fait intéressant, les TIMPs ciblent ADAM10, ADAM17, et MT1-MMP, qui sont toutes les trois des protéases connues pour le clivage de DLL1 (Six, Ndiaye et al. 2003, Dyczynska, Sun et al. 2007, Jin, Zhang et al. 2011). Ceci suggère que les TIMPs pourraient protéger DLL1 du clivage par ces enzymes. Alors qu'une telle fonction a déjà été proposée pour les TIMPs, elle n'a jamais été démontrée. Cependant, tel que mentionné précédemment, RECK, qui est un autre inhibiteur des métalloprotéinases, est capable de

protéger DLL1 du clivage par ADAM dans le système nerveux central (Muraguchi, Takegami et al. 2007). L'identification des TIMPs comme régulateurs positifs de DLL1 dans notre crible suggère qu'ils pourraient effectivement agir de manière similaire à RECK dans d'autres tissus ou contextes développementaux. En plus de la famille des TIMPs, notre crible a permis l'identification de plusieurs membres de la famille des SERPINs « serine protease inhibitors » en tant que régulateurs positifs du ligand DLL1. Ceci est en accord avec la réduction de l'expression de composants de l'homologue du groupe SERPINA3 humain suite à l'haploinsuffisance de *Dll1* chez la souris (Rubio-Aliaga, Przemeck et al. 2009), où les auteurs ont suggéré que les gènes dont l'expression est réduite agiraient à leur tour comme modulateurs de la voie de signalisation Notch, à travers des mécanismes de contrôle rétroactifs.

## **5.2. Validation physio-pathologique des nouveaux régulateurs par de puissants essais secondaires fonctionnels**

Par la suite, la mise au point d'essais physio-pathologiques de trans-activation de Notch nous a permis de valider la pertinence fonctionnelle des nouveaux régulateurs des ligands DLL1/4 identifiés par criblage. En effet, en utilisant de puissants cribles secondaires fonctionnels *in vitro*, nous avons pu démontrer sans ambiguïté l'importance de nos régulateurs dans le développement normal des cellules T, ainsi que dans le maintien des pré-LSCs dans le contexte pathologique de la LAL-T.

Nous avons d'abord montré que les régulateurs des ligands DSL nouvellement identifiés sont requis *in vitro*, durant l'étape de différenciation des thymocytes, du stade DN3 au stade DP. Notre contrôle positif, codant pour l'enzyme E3 ubiquitine ligase MIB1 a été préalablement démontré comme requis dans les cellules stromales OP9-DL1, afin d'induire la différenciation des progéniteurs thymiques précoces (PTPs) en thymocytes DN3; en utilisant un système de co-culture *in vitro*. Ainsi, il a été prouvé que la réduction de l'expression de *Mib1* par ARNi dans les cellules OP9-DL1 résulte en un arrêt du développement des progéniteurs de cellules T au stade DN1 (Song, Kim et al. 2008). À notre connaissance, notre

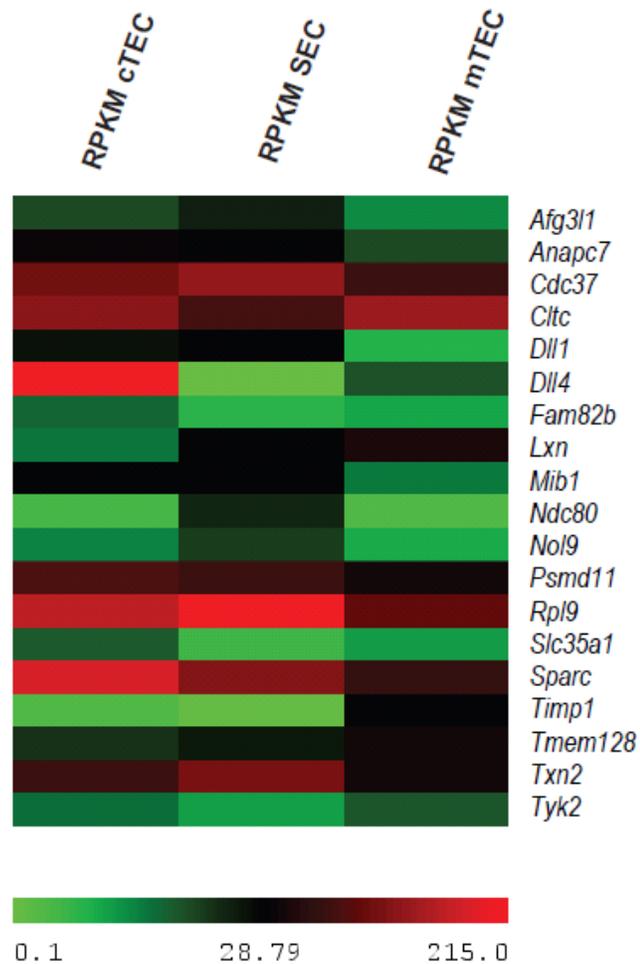
étude rapporte pour la première fois, le rôle de ce régulateur bien établi des ligands DSL, ainsi que de nouveaux régulateurs issus du crible, dans l'étape ultérieure de différenciation des thymocytes DN3 en cellules DP *in vitro*, conformément à l'importance fonctionnelle de *Notch1* dans les thymocytes DN3 (Tan, Visan et al. 2005, De Obaldia and Bhandoola 2015).

D'autre part, nous avons également démontré pour la première fois, le rôle de nombreux régulateurs des ligands DSL nouvellement identifiés par criblage, dans le maintien *in vitro* de la viabilité et de l'activité d'auto-renouvellement des pré-LSCs isolées du modèle murin transgénique *SCL-LMO1*. À savoir que le maintien des pré-LSCs dans ce modèle constitue un événement critique pour le développement de la LAL-T (Gerby, Tremblay et al. 2014). Remarquablement, les régulateurs les plus forts du crible de survie des pré-LSCs sont identiques à ceux du crible de différenciation des thymocytes DN3 normaux (Figure 12 page 90). Ceci suggère que les mêmes gènes contrôlent à la fois les processus physiologiques et pathologiques dépendants des ligands DSL dans le cadre de la signalisation Notch.

Il est intéressant de noter que l'analyse de données transcriptomiques provenant d'une étude récente qui porte sur l'expression différentielle des gènes dans les diverses populations de cellules épithéliales du thymus (St-Pierre, Brochu et al. 2013), nous a permis de trouver que la majorité de nos régulateurs les plus forts des ligands DSL sont bien exprimés dans les cellules thymiques épithéliales du cortex (cTECs). Ces dernières constituent le compartiment thymique où le ligand *Dll4* de Notch, qui est absolument requis pour le développement des cellules T *in vivo*, est extrêmement enrichi (Figure 26). Cette observation plaide fortement en faveur de la pertinence fonctionnelle des régulateurs que nous avons identifiés dans la modulation de la signalisation Notch *in vivo*.

## Abondance des transcrits par séquençage à ARN

(St-Pierre et al., 2013)



**Figure 26 :** Profils d'expression génique des régulateurs les plus forts des ligands DSL dans le thymus.

Représentation de l'expression de nos régulateurs en RPKM « Reads Per Kilobase per Million mapped reads » dans les cTECs, par comparaison aux cellules thymiques épithéliales médullaires (mTECs), et aux cellules épithéliales de la peau (SECs) d'après des données récentes de séquençage à ARN (St-Pierre, Brochu et al. 2013). Les régulateurs qui ne sont pas représentés sur la figure ont été exclus à cause de l'absence de leurs transcrits dans les cTECs.

En outre, plusieurs régulateurs des ligands DSL nouvellement identifiés dans nos cribles possèdent des fonctions préalablement connues, en relation avec le système hématopoïétique *in vivo*. Par exemple, le gène *Lxn*, qui code pour un inhibiteur des métallocarboxypeptidases zinc-dépendantes, est un régulateur des cellules souches hématopoïétiques (CSHs) qui affecte la taille de la population des CSHs chez les souris (Theodoraki, Kunjappu et al. 2007). De même, le gène *Mib1* est nécessaire au niveau des niches lymphopoïétiques pour le développement des cellules T et des cellules B de la zone marginale, à travers une signalisation Notch ligand-dépendante (Song, Kim et al. 2008). De plus, l'inactivation conditionnelle de *Mib1* dans le microenvironnement de la moelle osseuse conduit à un syndrome myéloprolifératif, avec des accumulations graduelles de granulocytes immatures, et une infiltration de leucocytes dans de nombreux organes (Poulin, Dong et al. 2005). D'autre part, la perte au niveau de la niche de la moelle osseuse, du gène *Sparc* « *secreted protein acidic and rich in cysteine* » qui code pour une protéine de la matrice extracellulaire, protège les CSHs de la toxicité liée à la chimiothérapie en accélérant leur retour à la quiescence (Lindberg, Popko-Scibor et al. 2010). Finalement, *Txn* « *thioredoxin* » a été identifié dans le microenvironnement de la moelle osseuse des souris comme agent radioprotecteur qui favorise la reconstitution des cellules du donneur (Ossipova, Ezan et al. 2009), et l'expression de *Lhx2* « *LIM homeobox protein 2* » favorise l'auto-renouvellement d'un progéniteur hématopoïétique multipotent dans les corps embryoïdes dérivés des cellules souches embryonnaires (Choe, Liao et al. 2007).

Conformément à cela, il serait pertinent de confirmer *in vivo* la fonction des principaux régulateurs des ligands DSL que nous avons validés dans les cribles secondaires physiopathologiques. Et ceci dans le but de déterminer leur importance dans la niche hématopoïétique pour le développement des cellules T et de la LAL-T, mais aussi pour l'auto-renouvellement des CSHs normales. En effet, les cellules sanguines sont générées tout le long de la vie à partir des CSHs qui résident dans la moelle osseuse. Le réservoir des CSHs se développe jusqu'à 3-4 semaines après la naissance, au moment où la moelle osseuse passe au mode adulte d'hématopoïèse (Bowie, Kent et al. 2007). En parallèle, les lymphocytes T sont produits dans le thymus qui augmente de taille exponentiellement après la naissance pour

atteindre l'homéostasie au bout de 7 jours. Étant donné que les thymocytes normaux ne possèdent pas d'activité d'auto-renouvellement, la production de cellules T dans le thymus dépend des progéniteurs hématopoïétiques générés à partir des CSHs, et provenant de la moelle osseuse. Tel que décrit en détail dans l'introduction, la signalisation Notch est essentielle pour la différenciation des progéniteurs de cellules T dans le thymus (Tan, Visan et al. 2005, Yashiro-Ohtani, Ohtani et al. 2010). Alors que la production des CSHs durant le développement embryonnaire dépend de la signalisation par Delta/Serrate-Notch1 chez la souris (Kumano, Chiba et al. 2003, Robert-Moreno, Espinosa et al. 2005) et chez la *Drosophila* (Lebestky, Jung et al. 2003), *Notch1* est dispensable pour la formation des CSHs adultes (Yuan, Kousis et al. 2010). Par la suite, il est tentant de spéculer que la déplétion conditionnelle de nos régulateurs des ligands dans le microenvironnement stromal de souris transgéniques *in vivo*, n'aurait pas d'effet sur le réservoir des CSHs dans la moelle osseuse adulte, bien qu'elle pourrait possiblement affecter les CSHs durant la phase d'expansion au cours de la première semaine post-natale. Par contre, étant donné que les thymocytes adultes sont sensibles aux niveaux du signal Notch1 (Tan, Visan et al. 2005), nous nous attendons à un effet drastique sur la différenciation des progéniteurs de cellules T suite à la déplétion de nos régulateurs, confirmant ainsi le rôle primordial de ces gènes dans la formation des lymphocytes T du système immunitaire. D'autre part, le maintien des pré-LSCs nécessite la signalisation par Notch1, de manière similaire au développement des DN3 normaux (Gerby, Tremblay et al. 2014). Par la suite, nous pensons que la déplétion des régulateurs des ligands *in vivo* altérerait l'auto-renouvellement des pré-LSCs issues de souris *SCL-LMO1*, sans pour autant affecter l'activité d'auto-renouvellement des CSHs normales au cours d'essais de transplantation dans des souris receveuses transgéniques déficientes pour nos gènes d'intérêt. La réduction de l'activité d'auto-renouvellement des pré-LSCs *in vivo* se traduirait par une inhibition de la progression de la LAL-T dans les souris receveuses déficientes pour nos gènes, par comparaison à des souris receveuses WT qui développeraient la LAL-T et finiraient par succomber à la maladie au bout de 6 à 9 mois (Gerby, Tremblay et al. 2014). Si cette hypothèse s'avère correcte, alors les régulateurs des ligands DSL ainsi identifiés pourraient servir de cibles thérapeutiques prometteuses pour la LAL-T car l'inhibition de leur fonction affecterait les pré-LSCs de façon sélective tout en épargnant les CSHs normales.

### **5.3. Ciblage des ligands dans le microenvironnement tumoral en tant que stratégie thérapeutique émergente**

Au cours de cette étude, nous avons utilisé l'essai de transplantation pour montrer que la co-culture des pré-LSCs issues du modèle *SCL-LMO1* avec des cellules stromales OP9-DL1 déplétées en *Mib1* ou *Tmem128*, deux des régulateurs les plus forts des cribles fonctionnels, est suffisante pour réduire considérablement l'activité d'auto-renouvellement des pré-LSCs. Étant donné que le maintien de l'activité d'auto-renouvellement de ces pré-LSCs est un événement critique pour le développement de la leucémie (Gerby, Tremblay et al. 2014), notre résultat suggère alors que les régulateurs des ligands DSL ainsi identifiés sont nécessaires pour la progression de la LAL-T *in vivo*. Ceci valide ces gènes en tant que candidats potentiels pour des stratégies thérapeutiques ciblant les ligands de Notch dans le cadre de la LAL-T.

D'autre part, des études antérieures ont démontré qu'au moment où la leucémie se manifeste, les cellules initiatrices de la leucémie demeurent sensibles à l'inhibition de la signalisation Notch, à la fois dans des cellules humaines et dans des modèles animaux de LAL-T (Armstrong, Brunet de la Grange et al. 2009, Gerby, Clappier et al. 2011, Medyouf, Gusscott et al. 2011, Tatarek, Cullion et al. 2011, Kong, Du et al. 2013). De même, plusieurs études récentes ont souligné l'importance de la signalisation Notch ligand-dépendante dans la croissance et l'invasion des cellules de la LAL-T. Ainsi, il a été démontré que la présence de DLL4 dans le microenvironnement tumoral joue un rôle primordial dans le développement des LAL-T *in vitro* et *in vivo*. Cependant, le phénotype d'inhibition de *Dll4 in vivo* est uniquement partiel, et ceci est probablement dû à la présence de DLL1 dans le microenvironnement tumoral de la moelle osseuse (Minuzzo, Agnusdei et al. 2015). Conformément à cela, l'expression des ligands de Notch dans les cellules stromales de la moelle osseuse serait essentielle pour la trans-activation de NOTCH1 au niveau des cellules leucémiques, afin d'induire l'invasion des cellules tumorales de la LAL-T (Yin, Ye et al. 2015). Par conséquent, ces évidences suggèrent que les régulateurs que nous avons identifiés dans notre étude pourraient également jouer un rôle plus tardif tout aussi important dans le maintien des cellules leucémiques transformées dans le cadre de la LAL-T.

De nos jours, la LAL-T présente généralement un bon pronostic, avec un taux de rémission de plus de 75% chez les enfants et de 50% chez les adultes. Cependant, la récurrence de la LAL-T demeure toujours associée à des taux élevés de mortalité, et les traitements actuels de cette maladie sont extrêmement agressifs, se basant principalement sur des chimiothérapies. De plus, l'utilisation des inhibiteurs de la gamma-sécrétase pour cibler la signalisation Notch dans le cadre de la LAL-T entraîne des effets secondaires sévères. Par conséquent, le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques plus efficaces visant à améliorer la qualité de vie des patients serait extrêmement utile, et notre cible offre des possibilités prometteuses de ciblage moléculaire dans ce contexte.

Remarquablement, des forces différentes de signal NOTCH1 sont requises pour imposer les processus de spécification des lignées cellulaires et de leucémogénèse (Weng, Ferrando et al. 2004, Bigas and Espinosa 2012), soulevant la possibilité qu'effectivement, la modulation du signal Notch pourrait être accomplie via la régulation des ligands DSL. Étant donné que les mutations de *NOTCH1* en cancer augmentent la force du signal, notre étude propose ainsi une stratégie pour réduire l'intensité du signal de Notch dans les cellules réceptrices par modulation des ligands DLL1/4 dans les cellules stromales émettrices du signal. Ceci est en accord avec les puissantes stratégies émergentes visant à cibler la niche ou le microenvironnement stromal afin d'éradiquer les cellules souches cancéreuses pour améliorer l'efficacité thérapeutique et empêcher la récurrence des cancers hématologiques (Konopleva, Tabe et al. 2009, Tsiftoglou, Bonovolias et al. 2009, Annaloro, Onida et al. 2011, Levesque, Winkler et al. 2013). En effet, le développement des leucémies requiert des interactions dynamiques entre les cellules leucémiques et les cellules stromales du microenvironnement, où des niches spécifiques permettent aux cellules souches cancéreuses d'acquiescer une résistance aux chimiothérapies. Les ligands DSL de la voie de signalisation Notch sont exprimés dans telles niches et constituent par la suite des cibles exploitables pour les thérapies leucémiques. Ceci est d'autant plus important que les traitements actuels des cancers hématologiques n'assurent pas un ciblage efficace des cellules souches leucémiques, à l'exception possiblement du trioxyde d'arsenic utilisé pour le traitement de la leucémie promyélocytaire. Par conséquent des stratégies émergentes de « nichothérapies », visant à sensibiliser les cellules souches leucémiques en ciblant les niches qui les protègent et les

supportent, offrent des opportunités croissantes pour améliorer l'efficacité des traitements anti-cancéreux.

Dans cette perspective, l'avenir des traitements leucémiques repose sur des thérapies moléculaires combinées visant à la fois les cellules tumorales et les cellules normales de la niche ou du microenvironnement. Pour ce qui est des cellules tumorales, les traitements actuels ou en cours de développement pour éradiquer les leucémies induisent la différenciation terminale, favorisent l'arrêt du cycle cellulaire, ou provoquent l'apoptose des cellules leucémiques. Ceux-ci comprennent entre autres de nouveaux antimétabolites, des agents d'hypométhylation de l'ADN, des inhibiteurs d'histone désacétylases, des microARNs, des anticorps monoclonaux contre des protéines de surface, des inhibiteurs de cycle cellulaire, et des agonistes de récepteurs pro-apoptotiques. D'autre part, en ce qui concerne les cellules normales de la niche, les traitements en cours visent à interférer avec les molécules de signalisation du microenvironnement qui favorisent la croissance et la survie des cellules tumorales. Dans ce contexte, les régulateurs des ligands DSL de Notch qui ont été identifiés dans notre étude constituent des possibilités moléculaires intéressantes pour cibler les cellules stromales de la LAL-T.

À notre connaissance, aucun des régulateurs des ligands identifiés dans notre étude ne possède d'inhibiteurs chimiques connus ni faisant l'objet d'études cliniques dans le cancer. Par contre, *Hsp90* qui est le partenaire de *Cdc37* identifié dans notre crible constitue une cible thérapeutique extrêmement intéressante en oncologie, et ses inhibiteurs ont été évalués dans le cadre d'études cliniques (Barrott and Haystead 2013, Miyata, Nakamoto et al. 2013). À noter qu'*Hsp90* en soi n'a pas été validé comme régulateur positif de Dll1 dans notre étude. En effet, la déplétion d'*Hsp90aa1* « *Heat shock protein 90 alpha (cytosolic), class A member 1* » a conduit à 21% d'inhibition du rapporteur luciférase de Notch dans le crible primaire, et celle d'*Hsp90ab1* « *Heat shock protein 90 alpha (cytosolic), class B member 1* » a conduit à 16% d'inhibition. Dans les deux cas, ces valeurs d'inhibition étaient au-dessous du seuil de positivité établi pour l'essai primaire, et encore une fois, nous pensons que la redondance des fonctions de ces deux membres de la même famille a empêché leur identification comme régulateurs positifs des ligands DSL de Notch dans notre essai. *Hsp90* code pour une chaperonne moléculaire impliquée dans la maturation et le repliement de nombreuses

protéines, y compris des kinases oncogéniques. Plusieurs inhibiteurs de cette chaperonne ont été identifiés. Ceux qui se lient à son domaine N-terminal responsable de la liaison à l'ATP sont particulièrement intéressants et font l'objet d'études cliniques pour les chimiothérapies du cancer. En effet, ils sont capables de bloquer l'activité d'HSP90 et de causer la dégradation par le protéasome de ses « protéines clientes », incluant les kinases oncogéniques et les récepteurs nucléaires, inhibant ainsi spécifiquement la croissance des cellules tumorales (Theodoraki, Kunjappu et al. 2007). Ainsi, *Hsp90* a été rapporté comme cible prometteuse pour le traitement de plusieurs cancers, mais au niveau des cellules tumorales en soi et non des cellules normales de la niche. Par exemple, l'utilisation d'un nouvel inhibiteur du domaine N-terminal d'HSP90, en combinaison ou non avec un inhibiteur d'HER2 « Human Epidermal growth factor Receptor 2 », présente de puissants effets anti-tumoraux dans les cancers du sein HER2-positifs. Cet inhibiteur agit en dissociant le complexe formé par HSP90/CDC37 et les « protéines clientes », et en induisant la dégradation des « protéines clientes » oncogéniques (Huang, Wu et al. 2015). De plus, il a été démontré que les co-chaperonnes comme CDC37 contribuent à l'efficacité des inhibiteurs connus d'HSP90 (Walton-Diaz, Khan et al. 2013), et que les inhibiteurs du domaine N-terminal d'HSP90 sont capables de déstabiliser le complexe formé par cette chaperonne avec CDC37 et la kinase cliente AKT par exemple, dans le contexte des voies de signalisation des cellules tumorales (Basso, Solit et al. 2002).

Conformément à cela, le complexe HSP90/CDC37 en soi a été décrit comme cible thérapeutique potentielle pour le cancer, ayant l'avantage de présenter une meilleure spécificité et moins d'effets secondaires en comparaison à l'inhibition directe d'HSP90. Ainsi, l'agent anti-tumoral Cucurbitacin D a été identifié comme inhibiteur du complexe hétéroprotéique d'HSP90, perturbant son interaction avec CDC37 et inhibant la machinerie de maturation des « protéines clientes » d'HSP90 (Hall, Seedarala et al. 2015). De plus, une approche bioinformatique a révélé le mode d'action d'un autre agent anti-cancéreux naturel comme inhibiteur efficace de l'interaction de CDC37 avec HSP90 (Grover, Shandilya et al. 2011). Remarquablement, un système de protéines recombinantes a été efficacement mis au point pour développer un crible chimique basé sur la bioluminescence, afin de découvrir des inhibiteurs de l'interaction HSP90/CDC37 *in vitro* (He, Niu et al. 2013). Par conséquent, il serait extrêmement intéressant d'exploiter ce système pour identifier des inhibiteurs chimiques

de l'interaction HSP90/CDC37, et d'explorer par la suite leur potentiel, ainsi que celui des inhibiteurs connus du domaine N-terminal d'HSP90, en tant que régulateurs de l'activité de signalisation des ligands DSL dans le cadre de nos essais de trans-activation de Notch. Ceci nous permettrait d'évaluer leur nouvelle fonction potentielle dans la réduction de la stabilité des ligands par inhibition du complexe CDC37/HSP90 dans le stroma des cellules OP9-DL1, plutôt que dans la déstabilisation des protéines oncogéniques au niveau des cellules cancéreuses tel que rapporté précédemment. Si un tel mécanisme s'avère confirmé dans le cadre de la voie de signalisation Notch, ces inhibiteurs pourraient alors être proposés comme alternatives pour cibler le microenvironnement afin d'éradiquer les cellules souches dans le contexte de la LAL-T.

## **5.4. Conclusions générales, Impacts, et Perspectives**

En conclusion, cette étude décrit le premier crible pan-génomique par ARNi visant spécifiquement à identifier des régulateurs des ligands DSL au niveau de la cellule émettrice du signal, dans le cadre de la voie Notch. Les données de ce criblage, ainsi que celles des essais de validation subséquents ont révélé de nouveaux régulateurs des ligands DLL1 et DLL4 de Notch qui sont impliqués dans des événements de signalisation physiologiques et pathologiques; incluant le développement des cellules T et le maintien des pré-LSCs dans le cadre de la LAL-T. Les gènes ainsi identifiés pourraient donc servir de cibles moléculaires potentielles pour développer de nouvelles stratégies thérapeutiques ciblant les ligands dans le microenvironnement tumoral. Dans ce contexte, le gène *Tmem128* revêt une importance toute particulière parce que c'est le premier régulateur nouvellement identifié des ligands dont nous avons démontré la fonction dans l'auto-renouvellement des pré-LSCs en utilisant des essais de transplantation *in vivo*. Ainsi la déplétion de ce gène dans des cellules OP9-DL1 en co-culture avec des pré-LSCs pour une durée de quatre jours est capable d'altérer suffisamment l'activité d'auto-renouvellement de ces pré-LSCs pour inhiber leur prise de greffe dans les thymus de souris receveuses; ceci étant un événement critique pour le développement de la LAL-T. Les expériences de caractérisation moléculaire de *Tmem128* et de *Cdc37*, un autre gène nouvellement identifié comme régulateur positif puissant de DLL1/4, nous ont permis de

concevoir une idée préliminaire sur leur mécanisme d'action sur les ligands DSL. Cependant, la compréhension complète des détails moléculaires sous-jacents aux fonctions de ces régulateurs sera essentielle afin de développer des inhibiteurs pharmacologiques pour bloquer leur action et entraver la signalisation Notch dans le cancer.

L'étude décrite dans cette thèse a donc des retombées importantes sur plusieurs domaines de la biologie, incluant la voie de signalisation Notch, la fonction thymique, et le développement du cancer, en particulier celui de la LAL-T. Pour ce qui est de la signalisation Notch, celle-ci joue un rôle fondamental dans les décisions de destins cellulaires dans tous les organismes multicellulaires, et ce projet a conduit à l'identification de nouvelles catégories de régulateurs de cette voie qui étaient auparavant ignorées dans la littérature. Par la suite, les résultats de ce criblage auraient un intérêt potentiel pour toute la communauté scientifique oeuvrant dans le domaine de la signalisation Notch. En effet, ces données ouvriront de nombreuses possibilités pour tester la pertinence fonctionnelle des régulateurs nouvellement identifiés (ou de leurs homologues) dans divers événements développementaux ligand-dépendants, à travers plusieurs espèces. Dans ce contexte, il est intéressant de noter que plusieurs régulateurs révélés par notre étude sont conservés entre les espèces. Par exemple, le gène *Tmem128* présente une conservation phylogénétique remarquable chez les vertébrés, ayant 89% et 70% d'homologies avec les orthologues chez l'humain et le poisson zébré respectivement. Ceci est en accord avec une fonction importante de ce régulateur au sein de la voie *Delta-Notch* qui est à son tour hautement conservée dans l'évolution. L'exploration future des mécanismes moléculaires de ces régulateurs permettrait certainement une meilleure compréhension des fonctions physiologiques de la voie de signalisation Notch au cours des événements du développement où ils sont impliqués.

D'autre part, en ce qui concerne la fonction thymique, cette étude revêt un intérêt particulier pour la compréhension du développement des lymphocytes T à travers la régulation des ligands DSL de Notch. En effet, la différenciation des progéniteurs de cellules T a lieu uniquement dans le thymus, et notre crible a révélé l'identité de nombreux régulateurs des ligands DLL1/4 qui sont nécessaires pour la différenciation des thymocytes *in vitro*, tout en présentant de bons niveaux d'expression *in vivo* dans le microenvironnement thymique où le ligand physiologique *Dll4* de Notch est extrêmement enrichi. Ceci suggérerait donc une

contribution tout aussi importante de ces gènes dans la fonction thymique *in vivo*. Dans ce contexte, il est intéressant de noter que le thymus subit un processus d'involution ou de décroissance progressive avec l'âge, à partir de la puberté, où le tissu lymphoïde est remplacé petit à petit par du tissu adipeux. Ce phénomène conduit à une perte progressive de la fonction thymique et à une réduction de la formation de cellules T entraînant un déficit immunitaire accompagné d'une plus grande susceptibilité aux infections et au cancer chez les sujets âgés (Linton and Dorshkind 2004, Aspinall, Pitts et al. 2010, Dooley and Liston 2012). Par la suite, la compréhension des propriétés uniques aux cellules thymiques stromales émettrices du signal et exprimant les ligands DSL de Notch pourrait avoir un intérêt thérapeutique extrêmement important pour l'ingénierie de tissus à fonction « thymus-like » afin de contourner les problèmes reliés à l'atrophie ou à l'involution du thymus qui survient avec l'âge. De ce point de vue, le renforcement de la fonction thymique et/ou le développement extra-thymique de cellules T constitueraient des alternatives importantes pour gérer le déclin du système immunitaire qui est la source principale des problèmes de santé des individus âgés (Heinonen and Perreault 2008).

Finalement, pour ce qui est du contexte pathologique du cancer, l'implication de la voie Notch est bien établie dans de nombreuses leucémies et tumeurs solides; et bien que nous ne l'ayons pas directement testé, nous pensons que les régulateurs des ligands DSL identifiés dans ce projet comme modulateurs de la LAL-T pourraient être également des cibles pour d'autres cancers Notch-dépendants. Alors que le ciblage de la voie de signalisation Notch serait utile pour une large gamme de cancers, la pan-inhibition de l'activité des récepteurs par des anticorps bloquants ou par des inhibiteurs de la gamma-sécrétase provoque des effets secondaires indésirables. Par contre l'inhibition des ligands constituerait une option moins délétère, étant donné qu'ils ont des profils d'expression plus restreints que les récepteurs, des fonctions mieux définies, et un taux de mutations bas en cancer. Ainsi, les ligands constituent des cibles thérapeutiques prometteuses et des études cliniques sont en cours afin de tester des anticorps bloquants contre le ligand DLL4 en particulier, pour réduire par exemple la vascularisation tumorale. Conformément à cela, les régulateurs des ligands DSL identifiés dans cette étude fournissent des possibilités additionnelles de ciblage moléculaire pour les traitements, notamment dans le cadre des stratégies thérapeutiques visant la niche ou le

microenvironnement stromal des cancers, incluant la LAL-T. Fait intéressant, toutes les expériences fonctionnelles que nous avons mis au point pour la validation de ces régulateurs des ligands pourraient être facilement adaptées à des essais de criblage haut-débit de petites molécules, afin de découvrir des composés pharmacologiques capables d'inhiber la signalisation Notch.

En perspectives, il serait intéressant de réaliser une première caractérisation d'autres régulateurs des ligands DLL1/4 identifiés dans le crible, en plus de *Tmem128* et *Cdc37*, dans le but d'explorer leur mécanisme moléculaire et leur potentiel en tant que cibles prometteuses pour la LAL-T. Dans ce contexte, il serait pertinent d'effectuer une analyse protéomique par spectrométrie de masse des interacteurs des ligands DLL1 et DLL4 dans les lignées OP9-DL1 et OP9-DL4 respectivement. Ceci nous permettra de savoir si certains des régulateurs nouvellement identifiés interagissent directement avec les ligands, et de caractériser l'interface de cette interaction pour déterminer si elle pourrait faire l'objet d'un ciblage pharmacologique potentiel. Cette approche complémentaire aux cribles fonctionnels déjà entrepris nous fournira ainsi une liste de candidats immédiats que nous pourrions prioriser. Nous pourrions par la suite déterminer leur mode d'action sur les ligands DSL, évaluer leur fonction *in vivo* dans la transformation des pré-LSCs en cellules T leucémiques, et développer éventuellement des composés chimiques pour inhiber leur action. D'autre part, notre crible a révélé d'autres régulateurs des ligands tout aussi importants, dont le mode d'action est relativement bien caractérisé, bien qu'ils n'interagissent pas directement avec les ligands DSL. Ceux-ci comprennent par exemple les inhibiteurs de protéases de la famille des TIMPs qui agissent sur les protéases ADAMs par un mécanisme connu afin de bloquer leur activité de protéolyse des ligands. Nous pourrions donc imaginer le développement d'un crible chimique pour identifier des inhibiteurs de l'interaction des TIMPs avec les ADAMs afin de favoriser le clivage des ligands DSL par ces derniers dans le but d'inactiver la signalisation Notch dans le cancer. Finalement, une investigation de la fonction des principaux régulateurs des ligands identifiés dans cette étude, au cours de l'angiogenèse et de la croissance tumorale de divers types de cancers Notch-dépendants revêt une importance majeure, avec un intérêt thérapeutique pour le ciblage moléculaire de ces différents cancers.

## Bibliographie

- Acar, M., H. Jafar-Nejad, H. Takeuchi, A. Rajan, D. Ibrani, N. A. Rana, H. Pan, R. S. Haltiwanger and H. J. Bellen (2008). "Rumi is a CAP10 domain glycosyltransferase that modifies Notch and is required for Notch signaling." *Cell* **132**(2): 247-258.
- Adam, M. G., C. Berger, A. Feldner, W. J. Yang, J. Wustehube-Lausch, S. E. Herberich, M. Pinder, S. Gesierich, H. P. Hammes, H. G. Augustin and A. Fischer (2013). "Synoptojanin-2 binding protein stabilizes the Notch ligands DLL1 and DLL4 and inhibits sprouting angiogenesis." *Circ Res* **113**(11): 1206-1218.
- Afelik, S. and J. Jensen (2013). "Notch signaling in the pancreas: patterning and cell fate specification." *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* **2**(4): 531-544.
- Agnusdei, V., S. Minuzzo, C. Frasson, A. Grassi, F. Axelrod, S. Satyal, A. Gurney, T. Hoey, E. Seganfredo, G. Basso, S. Valtorta, R. M. Moresco, A. Amadori and S. Indraccolo (2014). "Therapeutic antibody targeting of Notch1 in T-acute lymphoblastic leukemia xenografts." *Leukemia* **28**(2): 278-288.
- Agrawal, N., M. J. Frederick, C. R. Pickering, C. Bettegowda, K. Chang, R. J. Li, C. Fakhry, T. X. Xie, J. Zhang, J. Wang, N. Zhang, A. K. El-Naggar, S. A. Jasser, J. N. Weinstein, L. Trevino, J. A. Drummond, D. M. Muzny, Y. Wu, L. D. Wood, R. H. Hruban, W. H. Westra, W. M. Koch, J. A. Califano, R. A. Gibbs, D. Sidransky, B. Vogelstein, V. E. Velculescu, N. Papadopoulos, D. A. Wheeler, K. W. Kinzler and J. N. Myers (2011). "Exome sequencing of head and neck squamous cell carcinoma reveals inactivating mutations in NOTCH1." *Science* **333**(6046): 1154-1157.
- Ahimou, F., L. P. Mok, B. Bardot and C. Wesley (2004). "The adhesion force of Notch with Delta and the rate of Notch signaling." *J Cell Biol* **167**(6): 1217-1229.
- Alagille, D., M. Odievre, M. Gautier and J. P. Dommergues (1975). "Hepatic ductular hypoplasia associated with characteristic facies, vertebral malformations, retarded physical, mental, and sexual development, and cardiac murmur." *J Pediatr* **86**(1): 63-71.
- Albig, A. R., D. J. Becenti, T. G. Roy and W. P. Schiemann (2008). "Microfibril-associate glycoprotein-2 (MAGP-2) promotes angiogenic cell sprouting by blocking notch signaling in endothelial cells." *Microvasc Res* **76**(1): 7-14.
- Allman, D., A. Sambandam, S. Kim, J. P. Miller, A. Pagan, D. Well, A. Meraz and A. Bhandoola (2003). "Thymopoiesis independent of common lymphoid progenitors." *Nat Immunol* **4**(2): 168-174.
- Alton, A. K., K. Fechtel, C. C. Kopczynski, S. B. Shepard, P. J. Kooh and M. A. Muskavitch (1989). "Molecular genetics of Delta, a locus required for ectodermal differentiation in *Drosophila*." *Dev Genet* **10**(3): 261-272.
- Amsen, D., J. M. Blander, G. R. Lee, K. Tanigaki, T. Honjo and R. A. Flavell (2004). "Instruction of distinct CD4 T helper cell fates by different notch ligands on antigen-presenting cells." *Cell* **117**(4): 515-526.
- Anderson, M. S., E. S. Venanzi, L. Klein, Z. Chen, S. P. Berzins, S. J. Turley, H. von Boehmer, R. Bronson, A. Dierich, C. Benoist and D. Mathis (2002). "Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein." *Science* **298**(5597): 1395-1401.

- Andersson, E. R. and U. Lendahl (2014). "Therapeutic modulation of Notch signalling--are we there yet?" Nat Rev Drug Discov **13**(5): 357-378.
- Andersson, E. R., R. Sandberg and U. Lendahl (2011). "Notch signaling: simplicity in design, versatility in function." Development **138**(17): 3593-3612.
- Annaloro, C., F. Onida, G. Saporiti and G. Lambertenghi Delilieri (2011). "Cancer stem cells in hematological disorders: current and possible new therapeutic approaches." Curr Pharm Biotechnol **12**(2): 217-225.
- Aoyama, N., T. Yamakawa, T. Sasamura, Y. Yoshida, M. Ohori, H. Okubo, E. Iida, N. Sasaki, R. Ueda and K. Matsuno (2013). "Loss- and gain-of-function analyses of vacuolar protein sorting 2 in Notch signaling of *Drosophila melanogaster*." Genes Genet Syst **88**(1): 45-57.
- Aplan, P. D., C. A. Jones, D. S. Chervinsky, X. Zhao, M. Ellsworth, C. Wu, E. A. McGuire and K. W. Gross (1997). "An scl gene product lacking the transactivation domain induces bony abnormalities and cooperates with LMO1 to generate T-cell malignancies in transgenic mice." EMBO J **16**(9): 2408-2419.
- Armstrong, F., P. Brunet de la Grange, B. Gerby, M. C. Rouyez, J. Calvo, M. Fontenay, N. Boissel, H. Dombret, A. Baruchel, J. Landman-Parker, P. H. Romeo, P. Ballerini and F. Pflumio (2009). "NOTCH is a key regulator of human T-cell acute leukemia initiating cell activity." Blood **113**(8): 1730-1740.
- Artavanis-Tsakonas, S., M. A. Muskavitch and B. Yedvobnick (1983). "Molecular cloning of Notch, a locus affecting neurogenesis in *Drosophila melanogaster*." Proc Natl Acad Sci U S A **80**(7): 1977-1981.
- Ascano, J. M., L. J. Beverly and A. J. Capobianco (2003). "The C-terminal PDZ-ligand of JAGGED1 is essential for cellular transformation." J Biol Chem **278**(10): 8771-8779.
- Aspinall, R., D. Pitts, A. Lapenna and W. Mitchell (2010). "Immunity in the elderly: the role of the thymus." J Comp Pathol **142 Suppl 1**: S111-115.
- Austin, J. and J. Kimble (1987). "glp-1 is required in the germ line for regulation of the decision between mitosis and meiosis in *C. elegans*." Cell **51**(4): 589-599.
- Aydin, I. T., R. D. Melamed, S. J. Adams, M. Castillo-Martin, A. Demir, D. Bryk, G. Brunner, C. Cordon-Cardo, I. Osman, R. Rabadan and J. T. Celebi (2014). "FBXW7 mutations in melanoma and a new therapeutic paradigm." J Natl Cancer Inst **106**(6): dju107.
- Babaoglan, A. B., K. M. O'Connor-Giles, H. Mistry, A. Schickedanz, B. A. Wilson and J. B. Skeath (2009). "Sanpodo: a context-dependent activator and inhibitor of Notch signaling during asymmetric divisions." Development **136**(24): 4089-4098.
- Bajoghli, B., N. Aghaallaei, I. Hess, I. Rode, N. Netuschil, B. H. Tay, B. Venkatesh, J. K. Yu, S. L. Kaltenbach, N. D. Holland, D. Diekhoff, C. Happe, M. Schorpp and T. Boehm (2009). "Evolution of genetic networks underlying the emergence of thymopoiesis in vertebrates." Cell **138**(1): 186-197.
- Baker, N. E., M. Mlodzik and G. M. Rubin (1990). "Spacing differentiation in the developing *Drosophila* eye: a fibrinogen-related lateral inhibitor encoded by scabrous." Science **250**(4986): 1370-1377.
- Baladron, V., M. J. Ruiz-Hidalgo, M. L. Nueda, M. J. Diaz-Guerra, J. J. Garcia-Ramirez, E. Bonvini, E. Gubina and J. Laborda (2005). "dlk acts as a negative regulator of Notch1 activation through interactions with specific EGF-like repeats." Exp Cell Res **303**(2): 343-359.

- Banks, S. M., B. Cho, S. H. Eun, J. H. Lee, S. L. Windler, X. Xie, D. Bilder and J. A. Fischer (2011). "The functions of auxilin and Rab11 in *Drosophila* suggest that the fundamental role of ligand endocytosis in notch signaling cells is not recycling." *PLoS One* **6**(3): e18259.
- Barak, H., K. Surendran and S. C. Boyle (2012). "The role of Notch signaling in kidney development and disease." *Adv Exp Med Biol* **727**: 99-113.
- Bardin, A. J. and F. Schweisguth (2006). "Bearded family members inhibit Neuralized-mediated endocytosis and signaling activity of Delta in *Drosophila*." *Dev Cell* **10**(2): 245-255.
- Barolo, S., T. Stone, A. G. Bang and J. W. Posakony (2002). "Default repression and Notch signaling: Hairless acts as an adaptor to recruit the corepressors Groucho and dCtBP to Suppressor of Hairless." *Genes Dev* **16**(15): 1964-1976.
- Baron, M. (2012). "Endocytic routes to Notch activation." *Semin Cell Dev Biol* **23**(4): 437-442.
- Barrantes, I. B., A. J. Elia, K. Wunsch, M. H. Hrabe de Angelis, T. W. Mak, J. Rossant, R. A. Conlon, A. Gossler and J. L. de la Pompa (1999). "Interaction between Notch signalling and Lunatic fringe during somite boundary formation in the mouse." *Curr Biol* **9**(9): 470-480.
- Barrott, J. J. and T. A. Haystead (2013). "Hsp90, an unlikely ally in the war on cancer." *FEBS J* **280**(6): 1381-1396.
- Barsi, J. C., R. Rajendra, J. I. Wu and K. Artzt (2005). "Mind bomb1 is a ubiquitin ligase essential for mouse embryonic development and Notch signaling." *Mech Dev* **122**(10): 1106-1117.
- Barthet, G., A. Georgakopoulos and N. K. Robakis (2012). "Cellular mechanisms of gamma-secretase substrate selection, processing and toxicity." *Prog Neurobiol* **98**(2): 166-175.
- Bassil, R., W. Orent and W. Elyaman (2013). "Notch signaling and T-helper cells in EAE/MS." *Clin Dev Immunol* **2013**: 570731.
- Basso, A. D., D. B. Solit, G. Chiosis, B. Giri, P. Tsihchlis and N. Rosen (2002). "Akt forms an intracellular complex with heat shock protein 90 (Hsp90) and Cdc37 and is destabilized by inhibitors of Hsp90 function." *J Biol Chem* **277**(42): 39858-39866.
- Bauer, R. C., A. O. Laney, R. Smith, J. Gerfen, J. J. Morrissette, S. Woyciechowski, J. Garbarini, K. M. Loomes, I. D. Krantz, Z. Urban, B. D. Gelb, E. Goldmuntz and N. B. Spinner (2010). "Jagged1 (JAG1) mutations in patients with tetralogy of Fallot or pulmonic stenosis." *Hum Mutat* **31**(5): 594-601.
- Becam, I., U. M. Fiuza, A. M. Arias and M. Milan (2010). "A role of receptor Notch in ligand cis-inhibition in *Drosophila*." *Curr Biol* **20**(6): 554-560.
- Begley, C. G., P. D. Aplan, M. P. Davey, K. Nakahara, K. Tchorz, J. Kurtzberg, M. S. Hershfield, B. F. Haynes, D. I. Cohen, T. A. Waldmann and et al. (1989). "Chromosomal translocation in a human leukemic stem-cell line disrupts the T-cell antigen receptor delta-chain diversity region and results in a previously unreported fusion transcript." *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(6): 2031-2035.
- Bell, J. J. and A. Bhandoola (2008). "The earliest thymic progenitors for T cells possess myeloid lineage potential." *Nature* **452**(7188): 764-767.
- Benedito, R., C. Roca, I. Sorensen, S. Adams, A. Gossler, M. Fruttiger and R. H. Adams (2009). "The notch ligands Dll4 and Jagged1 have opposing effects on angiogenesis." *Cell* **137**(6): 1124-1135.

- Benhra, N., S. Lallet, M. Cotton, S. Le Bras, A. Dussert and R. Le Borgne (2011). "AP-1 controls the trafficking of Notch and Sanpodo toward E-cadherin junctions in sensory organ precursors." Curr Biol **21**(1): 87-95.
- Benhra, N., F. Vignaux, A. Dussert, F. Schweisguth and R. Le Borgne (2010). "Neutralized promotes basal to apical transcytosis of delta in epithelial cells." Mol Biol Cell **21**(12): 2078-2086.
- Beres, B. J., R. George, E. J. Lougher, M. Barton, B. C. Verrelli, C. J. McGlade, J. A. Rawls and J. Wilson-Rawls (2011). "Numb regulates Notch1, but not Notch3, during myogenesis." Mech Dev **128**(5-6): 247-257.
- Betschinger, J. and J. A. Knoblich (2004). "Dare to be different: asymmetric cell division in *Drosophila*, *C. elegans* and vertebrates." Curr Biol **14**(16): R674-685.
- Beverly, L. J., D. W. Felsner and A. J. Capobianco (2005). "Suppression of p53 by Notch in lymphomagenesis: implications for initiation and regression." Cancer Res **65**(16): 7159-7168.
- Bhat, K. M. (2014). "Notch signaling acts before cell division to promote asymmetric cleavage and cell fate of neural precursor cells." Sci Signal **7**(348): ra101.
- Bigas, A. and L. Espinosa (2012). "Hematopoietic stem cells: to be or Notch to be." Blood **119**(14): 3226-3235.
- Bigas, A., A. Robert-Moreno and L. Espinosa (2010). "The Notch pathway in the developing hematopoietic system." Int J Dev Biol **54**(6-7): 1175-1188.
- Boehm, T., L. Foroni, Y. Kaneko, M. F. Perutz and T. H. Rabbitts (1991). "The rhombotin family of cysteine-rich LIM-domain oncogenes: distinct members are involved in T-cell translocations to human chromosomes 11p15 and 11p13." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(10): 4367-4371.
- Bolos, V., J. Grego-Bessa and J. L. de la Pompa (2007). "Notch signaling in development and cancer." Endocr Rev **28**(3): 339-363.
- Boursalian, T. E., J. Golob, D. M. Soper, C. J. Cooper and P. J. Fink (2004). "Continued maturation of thymic emigrants in the periphery." Nat Immunol **5**(4): 418-425.
- Bowie, M. B., D. G. Kent, B. Dykstra, K. D. McKnight, L. McCaffrey, P. A. Hoodless and C. J. Eaves (2007). "Identification of a new intrinsically timed developmental checkpoint that reprograms key hematopoietic stem cell properties." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(14): 5878-5882.
- Bozkulak, E. C. and G. Weinmaster (2009). "Selective use of ADAM10 and ADAM17 in activation of Notch1 signaling." Mol Cell Biol **29**(21): 5679-5695.
- Brandt, S., U. Raffetseder, S. Djudjaj, A. Schreiter, B. Kadereit, M. Michele, M. Pabst, C. Zhu and P. R. Mertens (2012). "Cold shock Y-box protein-1 participates in signaling circuits with auto-regulatory activities." Eur J Cell Biol **91**(6-7): 464-471.
- Braune, E. B., K. Schuster-Gossler, M. Lyszkiewicz, K. Serth, K. Preusse, J. Madlung, B. Macek, A. Krueger and A. Gossler (2014). "S/T Phosphorylation of DLL1 Is Required for Full Ligand Activity In Vitro but Dispensable for DLL1 Function In Vivo during Embryonic Patterning and Marginal Zone B Cell Development." Mol Cell Biol **34**(7): 1221-1233.
- Bray, S. J. (2006). "Notch signalling: a simple pathway becomes complex." Nat Rev Mol Cell Biol **7**(9): 678-689.

- Bray, S. J., S. Takada, E. Harrison, S. C. Shen and A. C. Ferguson-Smith (2008). "The atypical mammalian ligand Delta-like homologue 1 (Dlk1) can regulate Notch signalling in *Drosophila*." BMC Dev Biol **8**: 11.
- Bridges, E., C. E. Oon and A. Harris (2011). "Notch regulation of tumor angiogenesis." Future Oncol **7**(4): 569-588.
- Briot, A. and M. L. Iruela-Arispe (2015). "Blockade of specific NOTCH ligands: a new promising approach in cancer therapy." Cancer Discov **5**(2): 112-114.
- Brohl, D., E. Vasyutina, M. T. Czajkowski, J. Griger, C. Rassek, H. P. Rahn, B. Purfurst, H. Wende and C. Birchmeier (2012). "Colonization of the satellite cell niche by skeletal muscle progenitor cells depends on Notch signals." Dev Cell **23**(3): 469-481.
- 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.
- Bulman, M. P., K. Kusumi, T. M. Frayling, C. McKeown, C. Garrett, E. S. Lander, R. Krumlauf, A. T. Hattersley, S. Ellard and P. D. Turnpenny (2000). "Mutations in the human delta homologue, DLL3, cause axial skeletal defects in spondylocostal dysostosis." Nat Genet **24**(4): 438-441.
- Buono, K. D., G. W. Robinson, C. Martin, S. Shi, P. Stanley, K. Tanigaki, T. Honjo and L. Hennighausen (2006). "The canonical Notch/RBP-J signaling pathway controls the balance of cell lineages in mammary epithelium during pregnancy." Dev Biol **293**(2): 565-580.
- Buxbaum, J. D., K. N. Liu, Y. Luo, J. L. Slack, K. L. Stocking, J. J. Peschon, R. S. Johnson, B. J. Castner, D. P. Cerretti and R. A. Black (1998). "Evidence that tumor necrosis factor alpha converting enzyme is involved in regulated alpha-secretase cleavage of the Alzheimer amyloid protein precursor." J Biol Chem **273**(43): 27765-27767.
- Cadavid, A. L., A. Ginzel and J. A. Fischer (2000). "The function of the *Drosophila* fat facets deubiquitinating enzyme in limiting photoreceptor cell number is intimately associated with endocytosis." Development **127**(8): 1727-1736.
- Calderwood, S. K. (2013). "Molecular cochaperones: tumor growth and cancer treatment." Scientifica (Cairo) **2013**: 217513.
- Calderwood, S. K. (2015). "Cdc37 as a co-chaperone to Hsp90." Subcell Biochem **78**: 103-112.
- 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.
- Canault, M., K. Certel, D. Schatzberg, D. D. Wagner and R. O. Hynes (2010). "The lack of ADAM17 activity during embryonic development causes hemorrhage and impairs vessel formation." PLoS One **5**(10): e13433.
- Cayouette, M. and M. Raff (2002). "Asymmetric segregation of Numb: a mechanism for neural specification from *Drosophila* to mammals." Nat Neurosci **5**(12): 1265-1269.
- Cayouette, M., A. V. Whitmore, G. Jeffery and M. Raff (2001). "Asymmetric segregation of Numb in retinal development and the influence of the pigmented epithelium." J Neurosci **21**(15): 5643-5651.
- Chapman, G., D. B. Sparrow, E. Kremmer and S. L. Dunwoodie (2011). "Notch inhibition by the ligand DELTA-LIKE 3 defines the mechanism of abnormal vertebral segmentation in spondylocostal dysostosis." Hum Mol Genet **20**(5): 905-916.

- Chen, F., H. Hasegawa, G. Schmitt-Ulms, T. Kawarai, C. Bohm, T. Katayama, Y. Gu, N. Sanjo, M. Glista, E. Rogaeva, Y. Wakutani, R. Pardossi-Piquard, X. Ruan, A. Tandon, F. Checler, P. Marambaud, K. Hansen, D. Westaway, P. St George-Hyslop and P. Fraser (2006). "TMP21 is a presenilin complex component that modulates gamma-secretase but not epsilon-secretase activity." Nature **440**(7088): 1208-1212.
- Chen, W. and D. Casey Corliss (2004). "Three modules of zebrafish Mind bomb work cooperatively to promote Delta ubiquitination and endocytosis." Dev Biol **267**(2): 361-373.
- Chen, X. and J. A. Fischer (2000). "In vivo Structure/Function analysis of the Drosophila fat facets deubiquitinating enzyme gene." Genetics **156**(4): 1829-1836.
- Chen, X., B. Zhang and J. A. Fischer (2002). "A specific protein substrate for a deubiquitinating enzyme: Liquid facets is the substrate of Fat facets." Genes Dev **16**(3): 289-294.
- Cheng, H. T., M. Kim, M. T. Valerius, K. Surendran, K. Schuster-Gossler, A. Gossler, A. P. McMahon and R. Kopan (2007). "Notch2, but not Notch1, is required for proximal fate acquisition in the mammalian nephron." Development **134**(4): 801-811.
- Cheruiyot, A., J. A. Lee, F. B. Gao and S. T. Ahmad (2014). "Expression of mutant CHMP2B, an ESCRT-III component involved in frontotemporal dementia, causes eye deformities due to Notch misregulation in Drosophila." FASEB J **28**(2): 667-675.
- Chiang, M. Y., L. Xu, O. Shestova, G. Histén, S. L'Heureux, C. Romany, M. E. Childs, P. A. Gimotty, J. C. Aster and W. S. Pear (2008). "Leukemia-associated NOTCH1 alleles are weak tumor initiators but accelerate K-ras-initiated leukemia." J Clin Invest **118**(9): 3181-3194.
- Childress, J. L., M. Acar, C. Tao and G. Halder (2006). "Lethal giant discs, a novel C2-domain protein, restricts notch activation during endocytosis." Curr Biol **16**(22): 2228-2233.
- Chillakuri, C. R., D. Sheppard, M. X. Ilagan, L. R. Holt, F. Abbott, S. Liang, R. Kopan, P. A. Handford and S. M. Lea (2013). "Structural analysis uncovers lipid-binding properties of Notch ligands." Cell Rep **5**(4): 861-867.
- Chitnis, A. (2006). "Why is delta endocytosis required for effective activation of notch?" Dev Dyn **235**(4): 886-894.
- Choe, E. A., L. Liao, J. Y. Zhou, D. Cheng, D. M. Duong, P. Jin, L. H. Tsai and J. Peng (2007). "Neuronal morphogenesis is regulated by the interplay between cyclin-dependent kinase 5 and the ubiquitin ligase mind bomb 1." J Neurosci **27**(35): 9503-9512.
- Choi, S. H., T. E. Wales, Y. Nam, D. J. O'Donovan, P. Sliz, J. R. Engen and S. C. Blacklow (2012). "Conformational locking upon cooperative assembly of notch transcription complexes." Structure **20**(2): 340-349.
- Ciofani, M., G. C. Knowles, D. L. Wiest, H. von Boehmer and J. C. Zuniga-Pflucker (2006). "Stage-specific and differential notch dependency at the alphabeta and gammadelta T lineage bifurcation." Immunity **25**(1): 105-116.
- Ciofani, M., T. M. Schmitt, A. Ciofani, A. M. Michie, N. Cuburu, A. Aublin, J. L. Maryanski and J. C. Zuniga-Pflucker (2004). "Obligatory role for cooperative signaling by pre-TCR and Notch during thymocyte differentiation." J Immunol **172**(9): 5230-5239.

- Ciofani, M. and J. C. Zuniga-Pflucker (2005). "Notch promotes survival of pre-T cells at the beta-selection checkpoint by regulating cellular metabolism." Nat Immunol **6**(9): 881-888.
- Ciofani, M. and J. C. Zuniga-Pflucker (2007). "The thymus as an inductive site for T lymphopoiesis." Annu Rev Cell Dev Biol **23**: 463-493.
- Coleman, M. L., M. A. McDonough, K. S. Hewitson, C. Coles, J. Mecinovic, M. Edelmann, K. M. Cook, M. E. Cockman, D. E. Lancaster, B. M. Kessler, N. J. Oldham, P. J. Ratcliffe and C. J. Schofield (2007). "Asparaginyl hydroxylation of the Notch ankyrin repeat domain by factor inhibiting hypoxia-inducible factor." J Biol Chem **282**(33): 24027-24038.
- Condorelli, G. L., F. Facchiano, M. Valtieri, E. Proietti, L. Vitelli, V. Lulli, K. Huebner, C. Peschle and C. M. Croce (1996). "T-cell-directed TAL-1 expression induces T-cell malignancies in transgenic mice." Cancer Res **56**(22): 5113-5119.
- Cordle, J., S. Johnson, J. Z. Tay, P. Roversi, M. B. Wilkin, B. H. de Madrid, H. Shimizu, S. Jensen, P. Whiteman, B. Jin, C. Redfield, M. Baron, S. M. Lea and P. A. Handford (2008). "A conserved face of the Jagged/Serrate DSL domain is involved in Notch trans-activation and cis-inhibition." Nat Struct Mol Biol **15**(8): 849-857.
- Cordle, J., C. Redfield, M. Stacey, P. A. van der Merwe, A. C. Willis, B. R. Champion, S. Hambleton and P. A. Handford (2008). "Localization of the delta-like-1-binding site in human Notch-1 and its modulation by calcium affinity." J Biol Chem **283**(17): 11785-11793.
- Cotton, M., N. Benhra and R. Le Borgne (2013). "Numb inhibits the recycling of Sanpodo in Drosophila sensory organ precursor." Curr Biol **23**(7): 581-587.
- Coumailleau, F., M. Furthauer, J. A. Knoblich and M. Gonzalez-Gaitan (2009). "Directional Delta and Notch trafficking in Sara endosomes during asymmetric cell division." Nature **458**(7241): 1051-1055.
- Coumailleau, F. and M. Gonzalez-Gaitan (2008). "From endocytosis to tumors through asymmetric cell division of stem cells." Curr Opin Cell Biol **20**(4): 462-469.
- Couturier, L., K. Mazouni and F. Schweisguth (2013). "Numb localizes at endosomes and controls the endosomal sorting of notch after asymmetric division in Drosophila." Curr Biol **23**(7): 588-593.
- Couturier, L., M. Trylinski, K. Mazouni, L. Darnet and F. Schweisguth (2014). "A fluorescent tagging approach in Drosophila reveals late endosomal trafficking of Notch and Sanpodo." J Cell Biol **207**(3): 351-363.
- Cui, X. Y., Q. D. Hu, M. Tekaya, Y. Shimoda, B. T. Ang, D. Y. Nie, L. Sun, W. P. Hu, M. Karsak, T. Duka, Y. Takeda, L. Y. Ou, G. S. Dawe, F. G. Yu, S. Ahmed, L. H. Jin, M. Schachner, K. Watanabe, Y. Arsenijevic and Z. C. Xiao (2004). "NB-3/Notch1 pathway via Deltex1 promotes neural progenitor cell differentiation into oligodendrocytes." J Biol Chem **279**(24): 25858-25865.
- Curtis, D. J., L. Robb, A. Strasser and C. G. Begley (1997). "The CD2-scl transgene alters the phenotype and frequency of T-lymphomas in N-ras transgenic or p53 deficient mice." Oncogene **15**(24): 2975-2983.
- D'Souza, B., L. Meloty-Kapella and G. Weinmaster (2010). "Canonical and non-canonical Notch ligands." Curr Top Dev Biol **92**: 73-129.
- D'Souza, B., A. Miyamoto and G. Weinmaster (2008). "The many facets of Notch ligands." Oncogene **27**(38): 5148-5167.

- Dai, Y., G. Wilson, B. Huang, M. Peng, G. Teng, D. Zhang, R. Zhang, M. P. Ebert, J. Chen, B. C. Wong, K. W. Chan, J. George and L. Qiao (2014). "Silencing of Jagged1 inhibits cell growth and invasion in colorectal cancer." *Cell Death Dis* **5**: e1170.
- Dallas, M. H., B. Varnum-Finney, C. Delaney, K. Kato and I. D. Bernstein (2005). "Density of the Notch ligand Delta1 determines generation of B and T cell precursors from hematopoietic stem cells." *J Exp Med* **201**(9): 1361-1366.
- Daskalaki, A., N. A. Shalaby, K. Kux, G. Tsoumpekos, G. D. Tsibidis, M. A. Muskavitch and C. Delidakis (2011). "Distinct intracellular motifs of Delta mediate its ubiquitylation and activation by Mindbomb1 and Neuralized." *J Cell Biol* **195**(6): 1017-1031.
- Davis, S. L., P. LoRousso, et al. (2013). "Abstract B48: a first-in-human Phase I study of the novel cancer stem cell (CSC) targeting antibody OMP-52M51 (anti-Notch1) administered intravenously to patients with certain advanced solid tumors". *Mol. Cancer Ther.* **12**, B48.
- de la Pompa, J. L., A. Wakeham, K. M. Correia, E. Samper, S. Brown, R. J. Aguilera, T. Nakano, T. Honjo, T. W. Mak, J. Rossant and R. A. Conlon (1997). "Conservation of the Notch signalling pathway in mammalian neurogenesis." *Development* **124**(6): 1139-1148.
- De Obaldia, M. E. and A. Bhandoola (2015). "Transcriptional regulation of innate and adaptive lymphocyte lineages." *Annu Rev Immunol* **33**: 607-642.
- De Smedt, M., K. Reynvoet, T. Kerre, T. Taghon, B. Verhasselt, B. Vandekerckhove, G. Leclercq and J. Plum (2002). "Active form of Notch imposes T cell fate in human progenitor cells." *J Immunol* **169**(6): 3021-3029.
- 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.
- Deblandre, G. A., E. C. Lai and C. Kintner (2001). "Xenopus neuralized is a ubiquitin ligase that interacts with XDelta1 and regulates Notch signaling." *Dev Cell* **1**(6): 795-806.
- del Alamo, D., H. Rouault and F. Schweisguth (2011). "Mechanism and significance of cis-inhibition in Notch signalling." *Curr Biol* **21**(1): R40-47.
- Delaney, C., B. Varnum-Finney, K. Aoyama, C. Brashem-Stein and I. D. Bernstein (2005). "Dose-dependent effects of the Notch ligand Delta1 on ex vivo differentiation and in vivo marrow repopulating ability of cord blood cells." *Blood* **106**(8): 2693-2699.
- Demarest, R. M., F. Ratti and A. J. Capobianco (2008). "It's T-ALL about Notch." *Oncogene* **27**(38): 5082-5091.
- Demehri, S., A. Turkoz and R. Kopan (2009). "Epidermal Notch1 loss promotes skin tumorigenesis by impacting the stromal microenvironment." *Cancer Cell* **16**(1): 55-66.
- Dias, S., R. Mansson, S. Gurbuxani, M. Sigvardsson and B. L. Kee (2008). "E2A proteins promote development of lymphoid-primed multipotent progenitors." *Immunity* **29**(2): 217-227.
- Diederich, R. J., K. Matsuno, H. Hing and S. Artavanis-Tsakonas (1994). "Cytosolic interaction between deltex and Notch ankyrin repeats implicates deltex in the Notch signaling pathway." *Development* **120**(3): 473-481.
- Doherty, D., G. Feger, S. Younger-Shepherd, L. Y. Jan and Y. N. Jan (1996). "Delta is a ventral to dorsal signal complementary to Serrate, another Notch ligand, in Drosophila wing formation." *Genes Dev* **10**(4): 421-434.

- Dooley, J. and A. Liston (2012). "Molecular control over thymic involution: from cytokines and microRNA to aging and adipose tissue." Eur J Immunol **42**(5): 1073-1079.
- Dornier, E., F. Coumailleau, J. F. Ottavi, J. Moretti, C. Boucheix, P. Mauduit, F. Schweisguth and E. Rubinstein (2012). "TspanC8 tetraspanins regulate ADAM10/Kuzbanian trafficking and promote Notch activation in flies and mammals." J Cell Biol **199**(3): 481-496.
- Dotto, G. P. (2008). "Notch tumor suppressor function." Oncogene **27**(38): 5115-5123.
- Du, X., Z. Cheng, Y. H. Wang, Z. H. Guo, S. Q. Zhang, J. K. Hu and Z. G. Zhou (2014). "Role of Notch signaling pathway in gastric cancer: a meta-analysis of the literature." World J Gastroenterol **20**(27): 9191-9199.
- Dunwoodie, S. L. (2009). "The role of Notch in patterning the human vertebral column." Curr Opin Genet Dev **19**(4): 329-337.
- Dunwoodie, S. L., D. Henrique, S. M. Harrison and R. S. Beddington (1997). "Mouse Dll3: a novel divergent Delta gene which may complement the function of other Delta homologues during early pattern formation in the mouse embryo." Development **124**(16): 3065-3076.
- Dyall, R. and J. Nikolic-Zugic (1995). "The majority of postselection CD4+ single-positive thymocytes requires the thymus to produce long-lived, functional T cells." J Exp Med **181**(1): 235-245.
- Dyczynska, E., D. Sun, H. Yi, A. Sehara-Fujisawa, C. P. Blobel and A. Zolkiewska (2007). "Proteolytic processing of delta-like 1 by ADAM proteases." J Biol Chem **282**(1): 436-444.
- Eiraku, M., Y. Hirata, H. Takeshima, T. Hirano and M. Kengaku (2002). "Delta/notch-like epidermal growth factor (EGF)-related receptor, a novel EGF-like repeat-containing protein targeted to dendrites of developing and adult central nervous system neurons." J Biol Chem **277**(28): 25400-25407.
- Eiraku, M., A. Tohgo, K. Ono, M. Kaneko, K. Fujishima, T. Hirano and M. Kengaku (2005). "DNER acts as a neuron-specific Notch ligand during Bergmann glial development." Nat Neurosci **8**(7): 873-880.
- El-Hashash, A. H., G. Turcatel, D. Al Alam, S. Buckley, H. Tokumitsu, S. Bellusci and D. Warburton (2011). "Eya1 controls cell polarity, spindle orientation, cell fate and Notch signaling in distal embryonic lung epithelium." Development **138**(7): 1395-1407.
- Eldadah, Z. A., A. Hamosh, N. J. Biery, R. A. Montgomery, M. Duke, R. Elkins and H. C. Dietz (2001). "Familial Tetralogy of Fallot caused by mutation in the jagged1 gene." Hum Mol Genet **10**(2): 163-169.
- Ellisen, L. W., J. Bird, D. C. West, A. L. Soreng, T. C. Reynolds, S. D. Smith and J. Sklar (1991). "TAN-1, the human homolog of the Drosophila notch gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms." Cell **66**(4): 649-661.
- Emery, G., A. Hutterer, D. Berdnik, B. Mayer, F. Wirtz-Peitz, M. G. Gaitan and J. A. Knoblich (2005). "Asymmetric Rab 11 endosomes regulate delta recycling and specify cell fate in the Drosophila nervous system." Cell **122**(5): 763-773.
- Emery, G. and J. A. Knoblich (2006). "Endosome dynamics during development." Curr Opin Cell Biol **18**(4): 407-415.
- Endo, K., M. R. Karim, H. Taniguchi, A. Krejci, E. Kinameri, M. Siebert, K. Ito, S. J. Bray and A. W. Moore (2012). "Chromatin modification of Notch targets in olfactory receptor neuron diversification." Nat Neurosci **15**(2): 224-233.

- Engel, I. and C. Murre (2001). "The function of E- and Id proteins in lymphocyte development." Nat Rev Immunol **1**(3): 193-199.
- Ercan, C., P. J. van Diest and M. Vooijs (2011). "Mammary development and breast cancer: the role of stem cells." Curr Mol Med **11**(4): 270-285.
- Espinosa, L., J. Ingles-Esteve, C. Aguilera and A. Bigas (2003). "Phosphorylation by glycogen synthase kinase-3 beta down-regulates Notch activity, a link for Notch and Wnt pathways." J Biol Chem **278**(34): 32227-32235.
- Estrach, S., J. Legg and F. M. Watt (2007). "Syntenin mediates Delta1-induced cohesiveness of epidermal stem cells in culture." J Cell Sci **120**(Pt 16): 2944-2952.
- Eun, S. H., S. M. Banks and J. A. Fischer (2008). "Auxilin is essential for Delta signaling." Development **135**(6): 1089-1095.
- Fabbri, G., S. Rasi, D. Rossi, V. Trifonov, H. Khiabani, J. Ma, A. Grunn, M. Fangazio, D. Capello, S. Monti, S. Cresta, E. Gargiulo, F. Forconi, A. Guarini, L. Arcaini, M. Paulli, L. Laurenti, L. M. Larocca, R. Marasca, V. Gattei, D. Oscier, F. Bertoni, C. G. Mullighan, R. Foa, L. Pasqualucci, R. Rabadan, R. Dalla-Favera and G. Gaidano (2011). "Analysis of the chronic lymphocytic leukemia coding genome: role of NOTCH1 mutational activation." J Exp Med **208**(7): 1389-1401.
- Fang, S., M. Ferrone, C. Yang, J. P. Jensen, S. Tiwari and A. M. Weissman (2001). "The tumor autocrine motility factor receptor, gp78, is a ubiquitin protein ligase implicated in degradation from the endoplasmic reticulum." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(25): 14422-14427.
- Farrell, A. and D. O. Morgan (2000). "Cdc37 promotes the stability of protein kinases Cdc28 and Cak1." Mol Cell Biol **20**(3): 749-754.
- Faux, C. H., A. M. Turnley, R. Epa, R. Cappai and P. F. Bartlett (2001). "Interactions between fibroblast growth factors and Notch regulate neuronal differentiation." J Neurosci **21**(15): 5587-5596.
- Felli, M. P., M. Maroder, T. A. Mitsiadis, A. F. Campese, D. Bellavia, A. Vacca, R. S. Mann, L. Frati, U. Lendahl, A. Gulino and I. Screpanti (1999). "Expression pattern of notch1, 2 and 3 and Jagged1 and 2 in lymphoid and stromal thymus components: distinct ligand-receptor interactions in intrathymic T cell development." Int Immunol **11**(7): 1017-1025.
- Fernandez-Valdivia, R., H. Takeuchi, A. Samarghandi, M. Lopez, J. Leonardi, R. S. Haltiwanger and H. Jafar-Nejad (2011). "Regulation of mammalian Notch signaling and embryonic development by the protein O-glucosyltransferase Rumi." Development **138**(10): 1925-1934.
- Ferrando, A. A. (2009). "The role of NOTCH1 signaling in T-ALL." Hematology Am Soc Hematol Educ Program: 353-361.
- Feyerabend, T. B., G. Terszowski, A. Tietz, C. Blum, H. Luche, A. Gossler, N. W. Gale, F. Radtke, H. J. Fehling and H. R. Rodewald (2009). "Deletion of Notch1 converts pro-T cells to dendritic cells and promotes thymic B cells by cell-extrinsic and cell-intrinsic mechanisms." Immunity **30**(1): 67-79.
- Fiuza, U. M. and A. M. Arias (2007). "Cell and molecular biology of Notch." J Endocrinol **194**(3): 459-474.
- Fiuza, U. M., T. Klein, A. Martinez Arias and P. Hayward (2010). "Mechanisms of ligand-mediated inhibition in Notch signaling activity in Drosophila." Dev Dyn **239**(3): 798-805.

- Fleming, R. J., T. N. Scottgale, R. J. Diederich and S. Artavanis-Tsakonas (1990). "The gene *Serrate* encodes a putative EGF-like transmembrane protein essential for proper ectodermal development in *Drosophila melanogaster*." *Genes Dev* **4**(12A): 2188-2201.
- Fouillade, C., M. Monet-Lepretre, C. Baron-Menguy and A. Joutel (2012). "Notch signalling in smooth muscle cells during development and disease." *Cardiovasc Res* **95**(2): 138-146.
- Fre, S., A. Bardin, S. Robine and D. Louvard (2011). "Notch signaling in intestinal homeostasis across species: the cases of *Drosophila*, Zebrafish and the mouse." *Exp Cell Res* **317**(19): 2740-2747.
- Fryer, C. J., J. B. White and K. A. Jones (2004). "Mastermind recruits CycC:CDK8 to phosphorylate the Notch ICD and coordinate activation with turnover." *Mol Cell* **16**(4): 509-520.
- Fuwa, T. J., K. Hori, T. Sasamura, J. Higgs, M. Baron and K. Matsuno (2006). "The first *deltex* null mutant indicates tissue-specific *deltex*-dependent Notch signaling in *Drosophila*." *Mol Genet Genomics* **275**(3): 251-263.
- Gameiro, J., P. Nagib and L. Verinaud (2010). "The thymus microenvironment in regulating thymocyte differentiation." *Cell Adh Migr* **4**(3): 382-390.
- Gao, J., J. Liu, D. Fan, H. Xu, Y. Xiong, Y. Wang, W. Xu, Y. Wang, Y. Cheng and G. Zheng (2011). "Up-regulated expression of Notch1 and Jagged1 in human colon adenocarcinoma." *Pathol Biol (Paris)* **59**(6): 298-302.
- Garbe, A. I., A. Krueger, F. Gounari, J. C. Zuniga-Pflucker and H. von Boehmer (2006). "Differential synergy of Notch and T cell receptor signaling determines alphabeta versus gammadelta lineage fate." *J Exp Med* **203**(6): 1579-1590.
- Garg, V., A. N. Muth, J. F. Ransom, M. K. Schluterman, R. Barnes, I. N. King, P. D. Grossfeld and D. Srivastava (2005). "Mutations in NOTCH1 cause aortic valve disease." *Nature* **437**(7056): 270-274.
- Gause, M., J. C. Eissenberg, A. F. Macrae, M. Dorsett, Z. Misulovin and D. Dorsett (2006). "Nipped-A, the Tra1/TRRAP subunit of the *Drosophila* SAGA and Tip60 complexes, has multiple roles in Notch signaling during wing development." *Mol Cell Biol* **26**(6): 2347-2359.
- Gazave, E., P. Lapebie, G. S. Richards, F. Brunet, A. V. Ereskovsky, B. M. Degnan, C. Borchiellini, M. Vervoort and E. Renard (2009). "Origin and evolution of the Notch signalling pathway: an overview from eukaryotic genomes." *BMC Evol Biol* **9**: 249.
- Geffers, I., K. Serth, G. Chapman, R. Jaekel, K. Schuster-Gossler, R. Cordes, D. B. Sparrow, E. Kremmer, S. L. Dunwoodie, T. Klein and A. Gossler (2007). "Divergent functions and distinct localization of the Notch ligands DLL1 and DLL3 in vivo." *J Cell Biol* **178**(3): 465-476.
- Gerby, B., E. Clappier, F. Armstrong, C. Deswarte, J. Calvo, S. Poglio, J. Soulier, N. Boissel, T. Leblanc, A. Baruchel, J. Landman-Parker, P. H. Romeo, P. Ballerini and F. Pflumio (2011). "Expression of CD34 and CD7 on human T-cell acute lymphoblastic leukemia discriminates functionally heterogeneous cell populations." *Leukemia* **25**(8): 1249-1258.
- Gerby, B., C. S. Tremblay, M. Tremblay, S. Rojas-Sutterlin, S. Herblot, J. Hebert, G. Sauvageau, S. Lemieux, E. Lecuyer, D. F. Veiga and T. Hoang (2014). "SCL, LMO1 and Notch1 Reprogram Thymocytes into Self-Renewing Cells." *PLoS Genet* **10**(12): e1004768.

- Gertsik, N., D. Chiu and Y. M. Li (2014). "Complex regulation of gamma-secretase: from obligatory to modulatory subunits." *Front Aging Neurosci* **6**: 342.
- Ghabrial, A. S. and M. A. Krasnow (2006). "Social interactions among epithelial cells during tracheal branching morphogenesis." *Nature* **441**(7094): 746-749.
- Glittenberg, M., C. Pitsouli, C. Garvey, C. Delidakis and S. Bray (2006). "Role of conserved intracellular motifs in Serrate signalling, cis-inhibition and endocytosis." *EMBO J* **25**(20): 4697-4706.
- Goardon, N., A. Schuh, I. Hajar, X. Ma, H. Jouault, E. Dzierzak, P. H. Romeo and L. Maouche-Chretien (2002). "Ectopic expression of TAL-1 protein in Ly-6E.1-htal-1 transgenic mice induces defects in B- and T-lymphoid differentiation." *Blood* **100**(2): 491-500.
- Gonczy, P. (2008). "Mechanisms of asymmetric cell division: flies and worms pave the way." *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**(5): 355-366.
- Gordon, W. R., K. L. Arnett and S. C. Blacklow (2008). "The molecular logic of Notch signaling--a structural and biochemical perspective." *J Cell Sci* **121**(Pt 19): 3109-3119.
- Gravano, D. M. and J. O. Manilay (2010). "Inhibition of proteolysis of Delta-like-1 does not promote or reduce T-cell developmental potential." *Immunol Cell Biol* **88**(7): 746-753.
- Gravano, D. M., B. T. McLelland, K. Horiuchi and J. O. Manilay (2010). "ADAM17 deletion in thymic epithelial cells alters aire expression without affecting T cell developmental progression." *PLoS One* **5**(10): e13528.
- Greenwald, I. (1985). "lin-12, a nematode homeotic gene, is homologous to a set of mammalian proteins that includes epidermal growth factor." *Cell* **43**(3 Pt 2): 583-590.
- Greenwald, I. (1998). "LIN-12/Notch signaling: lessons from worms and flies." *Genes Dev* **12**(12): 1751-1762.
- Greenwald, I. S., P. W. Sternberg and H. R. Horvitz (1983). "The lin-12 locus specifies cell fates in *Caenorhabditis elegans*." *Cell* **34**(2): 435-444.
- Gridley, T. (2010). "Notch signaling in the vasculature." *Curr Top Dev Biol* **92**: 277-309.
- Griffith, A. V., M. Fallahi, H. Nakase, M. Gosink, B. Young and H. T. Petrie (2009). "Spatial mapping of thymic stromal microenvironments reveals unique features influencing T lymphoid differentiation." *Immunity* **31**(6): 999-1009.
- Groth, C. and M. E. Fortini (2012). "Therapeutic approaches to modulating Notch signaling: current challenges and future prospects." *Semin Cell Dev Biol* **23**(4): 465-472.
- Grover, A., A. Shandilya, V. Agrawal, P. Pratik, D. Bhasme, V. S. Bisaria and D. Sundar (2011). "Hsp90/Cdc37 chaperone/co-chaperone complex, a novel junction anticancer target elucidated by the mode of action of herbal drug Withaferin A." *BMC Bioinformatics* **12 Suppl 1**: S30.
- Guarani, V., G. Deflorian, C. A. Franco, M. Kruger, L. K. Phng, K. Bentley, L. Toussaint, F. Dequiedt, R. Mostoslavsky, M. H. Schmidt, B. Zimmermann, R. P. Brandes, M. Mione, C. H. Westphal, T. Braun, A. M. Zeiher, H. Gerhardt, S. Dimmeler and M. Potente (2011). "Acetylation-dependent regulation of endothelial Notch signalling by the SIRT1 deacetylase." *Nature* **473**(7346): 234-238.
- Guarnaccia, C., S. Dhir, A. Pintar and S. Pongor (2009). "The tetralogy of Fallot-associated G274D mutation impairs folding of the second epidermal growth factor repeat in Jagged-1." *FEBS J* **276**(21): 6247-6257.

- Gupta-Rossi, N., O. Le Bail, H. Gonen, C. Brou, F. Logeat, E. Six, A. Ciechanover and A. Israel (2001). "Functional interaction between SEL-10, an F-box protein, and the nuclear form of activated Notch1 receptor." J Biol Chem **276**(37): 34371-34378.
- Gupta-Rossi, N., E. Six, O. LeBail, F. Logeat, P. Chastagner, A. Olry, A. Israel and C. Brou (2004). "Monoubiquitination and endocytosis direct gamma-secretase cleavage of activated Notch receptor." J Cell Biol **166**(1): 73-83.
- Gupta, R., D. Hong, F. Iborra, S. Sarno and T. Enver (2007). "NOV (CCN3) functions as a regulator of human hematopoietic stem or progenitor cells." Science **316**(5824): 590-593.
- Guruharsha, K. G., M. W. Kankel and S. Artavanis-Tsakonas (2012). "The Notch signalling system: recent insights into the complexity of a conserved pathway." Nat Rev Genet **13**(9): 654-666.
- Gutzmann, J. (2013). "Characterization of Tmem128 - An activity regulated ER protein, interacting with the immediate early gene Arc/Arg3.1". [http://www.diss.fu-berlin.de/diss/receive/FUDISS\\_thesis\\_000000095102](http://www.diss.fu-berlin.de/diss/receive/FUDISS_thesis_000000095102).
- Haenlin, M., B. Kramatschek and J. A. Campos-Ortega (1990). "The pattern of transcription of the neurogenic gene Delta of Drosophila melanogaster." Development **110**(3): 905-914.
- Hall, J. A., S. Seedarala, N. Rice, L. Kopel, F. Halaweish and B. S. Blagg (2015). "Cucurbitacin D Is a Disruptor of the HSP90 Chaperone Machinery." J Nat Prod **78**(4): 873-879.
- Hamel, S., J. Fantini and F. Schweisguth (2010). "Notch ligand activity is modulated by glycosphingolipid membrane composition in Drosophila melanogaster." J Cell Biol **188**(4): 581-594.
- 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.
- Hanlon, L., J. L. Avila, R. M. Demarest, S. Troutman, M. Allen, F. Ratti, A. K. Rustgi, B. Z. Stanger, F. Radtke, V. Adsay, F. Long, A. J. Capobianco and J. L. Kissil (2010). "Notch1 functions as a tumor suppressor in a model of K-ras-induced pancreatic ductal adenocarcinoma." Cancer Res **70**(11): 4280-4286.
- Hansson, E. M., F. Lanner, D. Das, A. Mutvei, U. Marklund, J. Ericson, F. Farnebo, G. Stumm, H. Stenmark, E. R. Andersson and U. Lendahl (2010). "Control of Notch-ligand endocytosis by ligand-receptor interaction." J Cell Sci **123**(Pt 17): 2931-2942.
- Hansson, E. M., U. Lendahl and G. Chapman (2004). "Notch signaling in development and disease." Semin Cancer Biol **14**(5): 320-328.
- Hansson, E. M., K. Stromberg, S. Bergstedt, G. Yu, J. Naslund, J. Lundkvist and U. Lendahl (2005). "Aph-1 interacts at the cell surface with proteins in the active gamma-secretase complex and membrane-tethered Notch." J Neurochem **92**(5): 1010-1020.
- He, F., K. Saito, N. Kobayashi, T. Harada, S. Watanabe, T. Kigawa, P. Guntert, O. Ohara, A. Tanaka, S. Unzai, Y. Muto and S. Yokoyama (2009). "Structural and functional characterization of the NHR1 domain of the Drosophila neuralized E3 ligase in the notch signaling pathway." J Mol Biol **393**(2): 478-495.

- He, J., X. Niu, C. Hu, H. Zhang, Y. Guo, Y. Ge, G. Wang and Y. Jiang (2013). "Expression and purification of recombinant NRL-Hsp90alpha and Cdc37-CRL proteins for in vitro Hsp90/Cdc37 inhibitors screening." *Protein Expr Purif* **92**(1): 119-127.
- Heath, J. K. (2010). "Transcriptional networks and signaling pathways that govern vertebrate intestinal development." *Curr Top Dev Biol* **90**: 159-192.
- Heath, V. (2011). "Genetics: New data on Hajdu-Cheney syndrome turns up bone research a NOTCH." *Nat Rev Endocrinol* **7**(6): 311.
- Heinonen, K. M. and C. Perreault (2008). "Development and functional properties of thymic and extrathymic T lymphocytes." *Crit Rev Immunol* **28**(5): 441-466.
- Heinzel, K., C. Benz, V. C. Martins, I. D. Haidl and C. C. Bleul (2007). "Bone marrow-derived hemopoietic precursors commit to the T cell lineage only after arrival in the thymic microenvironment." *J Immunol* **178**(2): 858-868.
- Heitzler, P. and P. Simpson (1991). "The choice of cell fate in the epidermis of *Drosophila*." *Cell* **64**(6): 1083-1092.
- Henderson, S. T., D. Gao, S. Christensen and J. Kimble (1997). "Functional domains of LAG-2, a putative signaling ligand for LIN-12 and GLP-1 receptors in *Caenorhabditis elegans*." *Mol Biol Cell* **8**(9): 1751-1762.
- Henderson, S. T., D. Gao, E. J. Lambie and J. Kimble (1994). "lag-2 may encode a signaling ligand for the GLP-1 and LIN-12 receptors of *C. elegans*." *Development* **120**(10): 2913-2924.
- Herblot, S., A. M. Steff, P. Hugo, P. D. Aplan and T. Hoang (2000). "SCL and LMO1 alter thymocyte differentiation: inhibition of E2A-HEB function and pre-T alpha chain expression." *Nat Immunol* **1**(2): 138-144.
- Heuss, S. F., D. Ndiaye-Lobry, E. M. Six, A. Israel and F. Logeat (2008). "The intracellular region of Notch ligands Dll1 and Dll3 regulates their trafficking and signaling activity." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(32): 11212-11217.
- Heuss, S. F., N. Tarantino, J. Fantini, D. Ndiaye-Lobry, J. Moretti, A. Israel and F. Logeat (2013). "A glycosphingolipid binding domain controls trafficking and activity of the mammalian notch ligand delta-like 1." *PLoS One* **8**(9): e74392.
- Hicks, C., S. H. Johnston, G. diSibio, A. Collazo, T. F. Vogt and G. Weinmaster (2000). "Fringe differentially modulates Jagged1 and Delta1 signalling through Notch1 and Notch2." *Nat Cell Biol* **2**(8): 515-520.
- Hicks, C., E. Ladi, C. Lindsell, J. J. Hsieh, S. D. Hayward, A. Collazo and G. Weinmaster (2002). "A secreted Delta1-Fc fusion protein functions both as an activator and inhibitor of Notch1 signaling." *J Neurosci Res* **68**(6): 655-667.
- Hiratochi, M., H. Nagase, Y. Kuramochi, C. S. Koh, T. Ohkawara and K. Nakayama (2007). "The Delta intracellular domain mediates TGF-beta/Activin signaling through binding to Smads and has an important bi-directional function in the Notch-Delta signaling pathway." *Nucleic Acids Res* **35**(3): 912-922.
- Hofmann, M., K. Schuster-Gossler, M. Watabe-Rudolph, A. Aulehla, B. G. Herrmann and A. Gossler (2004). "WNT signaling, in synergy with T/TBX6, controls Notch signaling by regulating Dll1 expression in the presomitic mesoderm of mouse embryos." *Genes Dev* **18**(22): 2712-2717.
- Holterman, C. E., F. Le Grand, S. Kuang, P. Seale and M. A. Rudnicki (2007). "Megf10 regulates the progression of the satellite cell myogenic program." *J Cell Biol* **179**(5): 911-922.

- Hori, K., M. Fostier, M. Ito, T. J. Fuwa, M. J. Go, H. Okano, M. Baron and K. Matsuno (2004). "Drosophila *deltex* mediates suppressor of Hairless-independent and late-endosomal activation of Notch signaling." *Development* **131**(22): 5527-5537.
- Hori, K., T. J. Fuwa, T. Seki and K. Matsuno (2005). "Genetic regions that interact with loss- and gain-of-function phenotypes of *deltex* implicate novel genes in Drosophila Notch signaling." *Mol Genet Genomics* **272**(6): 627-638.
- Hori, K., A. Sen and S. Artavanis-Tsakonas (2014). "Genetic circuitry modulating notch signals through endosomal trafficking." *Methods Enzymol* **534**: 283-299.
- Hozumi, K., N. Abe, S. Chiba, H. Hirai and S. Habu (2003). "Active form of Notch members can enforce T lymphopoiesis on lymphoid progenitors in the monolayer culture specific for B cell development." *J Immunol* **170**(10): 4973-4979.
- Hozumi, K., C. Mailhos, N. Negishi, K. Hirano, T. Yahata, K. Ando, S. Zuklys, G. A. Hollander, D. T. Shima and S. Habu (2008). "Delta-like 4 is indispensable in thymic environment specific for T cell development." *J Exp Med* **205**(11): 2507-2513.
- Hozumi, K., N. Negishi, D. Suzuki, N. Abe, Y. Sotomaru, N. Tamaoki, C. Mailhos, D. Ish-Horowicz, S. Habu and M. J. Owen (2004). "Delta-like 1 is necessary for the generation of marginal zone B cells but not T cells in vivo." *Nat Immunol* **5**(6): 638-644.
- Hu, Q. D., B. T. Ang, M. Karsak, W. P. Hu, X. Y. Cui, T. Duka, Y. Takeda, W. Chia, N. Sankar, Y. K. Ng, E. A. Ling, T. Maciag, D. Small, R. Trifonova, R. Kopan, H. Okano, M. Nakafuku, S. Chiba, H. Hirai, J. C. Aster, M. Schachner, C. J. Pallen, K. Watanabe and Z. C. Xiao (2003). "F3/contactin acts as a functional ligand for Notch during oligodendrocyte maturation." *Cell* **115**(2): 163-175.
- Huang da, W., B. T. Sherman and R. A. Lempicki (2009). "Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists." *Nucleic Acids Res* **37**(1): 1-13.
- Huang da, W., B. T. Sherman and R. A. Lempicki (2009). "Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources." *Nat Protoc* **4**(1): 44-57.
- Huang, W., Q. D. Wu, M. Zhang, Y. L. Kong, P. R. Cao, W. Zheng, J. H. Xu and M. Ye (2015). "Novel Hsp90 inhibitor FW-04-806 displays potent antitumor effects in HER2-positive breast cancer cells as a single agent or in combination with lapatinib." *Cancer Lett* **356**(2 Pt B): 862-871.
- Hurlbut, G. D., M. W. Kankel, R. J. Lake and S. Artavanis-Tsakonas (2007). "Crossing paths with Notch in the hyper-network." *Curr Opin Cell Biol* **19**(2): 166-175.
- Ikawa, T., H. Kawamoto, A. W. Goldrath and C. Murre (2006). "E proteins and Notch signaling cooperate to promote T cell lineage specification and commitment." *J Exp Med* **203**(5): 1329-1342.
- Ingles-Esteve, J., L. Espinosa, L. A. Milner, C. Caelles and A. Bigas (2001). "Phosphorylation of Ser2078 modulates the Notch2 function in 32D cell differentiation." *J Biol Chem* **276**(48): 44873-44880.
- Ishio, A., T. Sasamura, T. Ayukawa, J. Kuroda, H. O. Ishikawa, N. Aoyama, K. Matsumoto, T. Gushiken, T. Okajima, T. Yamakawa and K. Matsuno (2015). "O-fucose monosaccharide of Drosophila Notch has a temperature-sensitive function and cooperates with O-glucose glycan in Notch transport and Notch signaling activation." *J Biol Chem* **290**(1): 505-519.

- Itoh, M., C. H. Kim, G. Palardy, T. Oda, Y. J. Jiang, D. Maust, S. Y. Yeo, K. Lorick, G. J. Wright, L. Ariza-McNaughton, A. M. Weissman, J. Lewis, S. C. Chandrasekharappa and A. B. Chitnis (2003). "Mind bomb is a ubiquitin ligase that is essential for efficient activation of Notch signaling by Delta." *Dev Cell* **4**(1): 67-82.
- Jaekel, R. and T. Klein (2006). "The Drosophila Notch inhibitor and tumor suppressor gene lethal (2) giant discs encodes a conserved regulator of endosomal trafficking." *Dev Cell* **11**(5): 655-669.
- Jafar-Nejad, H., H. K. Andrews, M. Acar, V. Bayat, F. Wirtz-Peitz, S. Q. Mehta, J. A. Knoblich and H. J. Bellen (2005). "Sec15, a component of the exocyst, promotes notch signaling during the asymmetric division of Drosophila sensory organ precursors." *Dev Cell* **9**(3): 351-363.
- Jaleco, A. C., H. Neves, E. Hooijberg, P. Gameiro, N. Clode, M. Haury, D. Henrique and L. Parreira (2001). "Differential effects of Notch ligands Delta-1 and Jagged-1 in human lymphoid differentiation." *J Exp Med* **194**(7): 991-1002.
- Jehn, B. M., I. Dittert, S. Beyer, K. von der Mark and W. Bielke (2002). "c-Cbl binding and ubiquitin-dependent lysosomal degradation of membrane-associated Notch1." *J Biol Chem* **277**(10): 8033-8040.
- Jenkins, D. W., S. Ross, M. Veldman-Jones, I. N. Foltz, B. C. Clavette, K. Manchulenko, C. Eberlein, J. Kendrew, P. Petteruti, S. Cho, M. Damschroder, L. Peng, D. Baker, N. R. Smith, H. M. Weir, D. C. Blakey, V. Bedian and S. T. Barry (2012). "MEDI0639: a novel therapeutic antibody targeting Dll4 modulates endothelial cell function and angiogenesis in vivo." *Mol Cancer Ther* **11**(8): 1650-1660.
- Jiang, R., Y. Lan, H. D. Chapman, C. Shawber, C. R. Norton, D. V. Serreze, G. Weinmaster and T. Gridley (1998). "Defects in limb, craniofacial, and thymic development in Jagged2 mutant mice." *Genes Dev* **12**(7): 1046-1057.
- Jin, E. J., Y. A. Choi, J. K. Sonn and S. S. Kang (2007). "Suppression of ADAM 10-induced Delta-1 shedding inhibits cell proliferation during the chondro-inhibitory action of TGF-beta3." *Mol Cells* **24**(1): 139-147.
- Jin, G., F. Zhang, K. M. Chan, H. L. Xavier Wong, B. Liu, K. S. Cheah, X. Liu, C. Mauch, D. Liu and Z. Zhou (2011). "MT1-MMP cleaves Dll1 to negatively regulate Notch signalling to maintain normal B-cell development." *EMBO J* **30**(11): 2281-2293.
- Jinwal, U. K., J. H. Trotter, J. F. Abisambra, J. Koren, 3rd, L. Y. Lawson, G. D. Vestal, J. C. O'Leary, 3rd, A. G. Johnson, Y. Jin, J. R. Jones, Q. Li, E. J. Weeber and C. A. Dickey (2011). "The Hsp90 kinase co-chaperone Cdc37 regulates tau stability and phosphorylation dynamics." *J Biol Chem* **286**(19): 16976-16983.
- John, G. R., S. L. Shankar, B. Shafit-Zagardo, A. Massimi, S. C. Lee, C. S. Raine and C. F. Brosnan (2002). "Multiple sclerosis: re-expression of a developmental pathway that restricts oligodendrocyte maturation." *Nat Med* **8**(10): 1115-1121.
- Jorissen, E. and B. De Strooper (2010). "Gamma-secretase and the intramembrane proteolysis of Notch." *Curr Top Dev Biol* **92**: 201-230.
- 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-Lasserre (1996). "Notch3 mutations in CADASIL, a hereditary adult-onset condition causing stroke and dementia." *Nature* **383**(6602): 707-710.

- Kadam, S. and B. M. Emerson (2003). "Transcriptional specificity of human SWI/SNF BRG1 and BRM chromatin remodeling complexes." *Mol Cell* **11**(2): 377-389.
- Kaether, C., S. Schmitt, M. Willem and C. Haass (2006). "Amyloid precursor protein and Notch intracellular domains are generated after transport of their precursors to the cell surface." *Traffic* **7**(4): 408-415.
- Kamath, B. M., G. Podkameni, A. L. Hutchinson, L. D. Leonard, J. Gerfen, I. D. Krantz, D. A. Piccoli, N. B. Spinner, K. M. Loomes and K. Meyers (2012). "Renal anomalies in Alagille syndrome: a disease-defining feature." *Am J Med Genet A* **158A**(1): 85-89.
- Kametaka, S., A. Kametaka, S. Yonekura, M. Haruta, S. Takenoshita, S. Goto and S. Waguri (2012). "AP-1 clathrin adaptor and CG8538/Aftiphilin are involved in Notch signaling during eye development in *Drosophila melanogaster*." *J Cell Sci* **125**(Pt 3): 634-648.
- Kandachar, V. and F. Roegiers (2012). "Endocytosis and control of Notch signaling." *Curr Opin Cell Biol* **24**(4): 534-540.
- Kangsamaksin, T., A. Murtomaki, N. M. Kofler, H. Cuervo, R. A. Chaudhri, I. W. Tattersall, P. E. Rosenstiel, C. J. Shawber and J. Kitajewski (2015). "NOTCH decoys that selectively block DLL/NOTCH or JAG/NOTCH disrupt angiogenesis by unique mechanisms to inhibit tumor growth." *Cancer Discov* **5**(2): 182-197.
- Kannan, S., R. M. Sutphin, M. G. Hall, L. S. Golfman, W. Fang, R. M. Nolo, L. J. Akers, R. A. Hammitt, J. S. McMurray, S. M. Kornblau, A. M. Melnick, M. E. Figueroa and P. A. Zweidler-McKay (2013). "Notch activation inhibits AML growth and survival: a potential therapeutic approach." *J Exp Med* **210**(2): 321-337.
- Kato, T. M., A. Kawaguchi, Y. Kosodo, H. Niwa and F. Matsuzaki (2010). "Lunatic fringe potentiates Notch signaling in the developing brain." *Mol Cell Neurosci* **45**(1): 12-25.
- Kechad, A., C. Jolicoeur, A. Tufford, P. Mattar, R. W. Chow, W. A. Harris and M. Cayouette (2012). "Numb is required for the production of terminal asymmetric cell divisions in the developing mouse retina." *J Neurosci* **32**(48): 17197-17210.
- Kee, B. L. (2009). "E and ID proteins branch out." *Nat Rev Immunol* **9**(3): 175-184.
- Kershaw, N. J., N. L. Church, M. D. Griffin, C. S. Luo, T. E. Adams and A. W. Burgess (2015). "Notch ligand Delta-like1: X-ray crystal structure and binding affinity." *Biochem J*.
- Khurana, S. and J. C. Mills (2010). "The gastric mucosa development and differentiation." *Prog Mol Biol Transl Sci* **96**: 93-115.
- Kidd, S., M. R. Kelley and M. W. Young (1986). "Sequence of the notch locus of *Drosophila melanogaster*: relationship of the encoded protein to mammalian clotting and growth factors." *Mol Cell Biol* **6**(9): 3094-3108.
- Kim, B. W., A. M. Zavacki, C. Curcio-Morelli, M. Dentice, J. W. Harney, P. R. Larsen and A. C. Bianco (2003). "Endoplasmic reticulum-associated degradation of the human type 2 iodothyronine deiodinase (D2) is mediated via an association between mammalian UBC7 and the carboxyl region of D2." *Mol Endocrinol* **17**(12): 2603-2612.
- Kim, W., Y. K. Shin, B. J. Kim and J. M. Egan (2010). "Notch signaling in pancreatic endocrine cell and diabetes." *Biochem Biophys Res Commun* **392**(3): 247-251.
- Kinameri, E., T. Inoue, J. Aruga, I. Imayoshi, R. Kageyama, T. Shimogori and A. W. Moore (2008). "Prdm proto-oncogene transcription factor family expression and interaction with the Notch-Hes pathway in mouse neurogenesis." *PLoS One* **3**(12): e3859.
- Klinakis, A., C. Lobry, O. Abdel-Wahab, P. Oh, H. Haeno, S. Buonamici, I. van De Walle, S. Cathelin, T. Trimarchi, E. Araldi, C. Liu, S. Ibrahim, M. Beran, J. Zavadil, A.

- Efstratiadis, T. Taghon, F. Michor, R. L. Levine and I. Aifantis (2011). "A novel tumour-suppressor function for the Notch pathway in myeloid leukaemia." Nature **473**(7346): 230-233.
- Klug, K. M. and M. A. Muskavitch (1999). "Ligand-receptor interactions and trans-endocytosis of Delta, Serrate and Notch: members of the Notch signalling pathway in *Drosophila*." J Cell Sci **112** ( Pt 19): 3289-3297.
- Koch, U., E. Fiorini, R. Benedito, V. Besseyrias, K. Schuster-Gossler, M. Pierres, N. R. Manley, A. Duarte, H. R. Macdonald and F. Radtke (2008). "Delta-like 4 is the essential, nonredundant ligand for Notch1 during thymic T cell lineage commitment." J Exp Med **205**(11): 2515-2523.
- Kolev, V., D. Kacer, R. Trifonova, D. Small, M. Duarte, R. Soldi, I. Graziani, O. Sideleva, B. Larman, T. Maciag and I. Prudovsky (2005). "The intracellular domain of Notch ligand Delta1 induces cell growth arrest." FEBS Lett **579**(25): 5798-5802.
- Komatsu, H., M. Y. Chao, J. Larkins-Ford, M. E. Corkins, G. A. Somers, T. Tucey, H. M. Dionne, J. Q. White, K. Wani, M. Boxem and A. C. Hart (2008). "OSM-11 facilitates LIN-12 Notch signaling during *Caenorhabditis elegans* vulval development." PLoS Biol **6**(8): e196.
- Kong, G., J. Du, Y. Liu, B. Meline, Y. I. Chang, E. A. Ranheim, J. Wang and J. Zhang (2013). "Notch1 gene mutations target KRAS G12D-expressing CD8+ cells and contribute to their leukemogenic transformation." J Biol Chem **288**(25): 18219-18227.
- Konopleva, M., Y. Tabe, Z. Zeng and M. Andreeff (2009). "Therapeutic targeting of microenvironmental interactions in leukemia: mechanisms and approaches." Drug Resist Updat **12**(4-5): 103-113.
- Koo, B. K., H. S. Lim, R. Song, M. J. Yoon, K. J. Yoon, J. S. Moon, Y. W. Kim, M. C. Kwon, K. W. Yoo, M. P. Kong, J. Lee, A. B. Chitnis, C. H. Kim and Y. Y. Kong (2005). "Mind bomb 1 is essential for generating functional Notch ligands to activate Notch." Development **132**(15): 3459-3470.
- Koo, B. K., K. J. Yoon, K. W. Yoo, H. S. Lim, R. Song, J. H. So, C. H. Kim and Y. Y. Kong (2005). "Mind bomb-2 is an E3 ligase for Notch ligand." J Biol Chem **280**(23): 22335-22342.
- Koo, B. K., M. J. Yoon, K. J. Yoon, S. K. Im, Y. Y. Kim, C. H. Kim, P. G. Suh, Y. N. Jan and Y. Y. Kong (2007). "An obligatory role of mind bomb-1 in notch signaling of mammalian development." PLoS One **2**(11): e1221.
- Kopan, R. and M. X. Ilagan (2009). "The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism." Cell **137**(2): 216-233.
- Kopczynski, C. C. and M. A. Muskavitch (1989). "Complex spatio-temporal accumulation of alternative transcripts from the neurogenic gene Delta during *Drosophila* embryogenesis." Development **107**(3): 623-636.
- Kovall, R. A. and S. C. Blacklow (2010). "Mechanistic insights into Notch receptor signaling from structural and biochemical studies." Curr Top Dev Biol **92**: 31-71.
- Kressmann, S., C. Campos, I. Castanon, M. Furthauer and M. Gonzalez-Gaitan (2015). "Directional Notch trafficking in Sara endosomes during asymmetric cell division in the spinal cord." Nat Cell Biol **17**(3): 333-339.
- Krivtsov, A. V., F. N. Rozov, M. V. Zinovyeva, P. J. Hendrikx, Y. Jiang, J. W. Visser and A. V. Belyavsky (2007). "Jedi--a novel transmembrane protein expressed in early hematopoietic cells." J Cell Biochem **101**(3): 767-784.

- Krop, I., T. Demuth, T. Guthrie, P. Y. Wen, W. P. Mason, P. Chinnaiyan, N. Butowski, M. D. Groves, S. Kesari, S. J. Freedman, S. Blackman, J. Watters, A. Loboda, A. Podtelezhnikov, J. Lunceford, C. Chen, M. Giannotti, J. Hing, R. Beckman and P. Lorusso (2012). "Phase I pharmacologic and pharmacodynamic study of the gamma secretase (Notch) inhibitor MK-0752 in adult patients with advanced solid tumors." J Clin Oncol **30**(19): 2307-2313.
- Kumano, K., S. Chiba, A. Kunisato, M. Sata, T. Saito, E. Nakagami-Yamaguchi, T. Yamaguchi, S. Masuda, K. Shimizu, T. Takahashi, S. Ogawa, Y. Hamada and H. Hirai (2003). "Notch1 but not Notch2 is essential for generating hematopoietic stem cells from endothelial cells." Immunity **18**(5): 699-711.
- Kuramoto, T., H. Goto, A. Mitsuhashi, S. Tabata, H. Ogawa, H. Uehara, A. Saijo, S. Kakiuchi, Y. Maekawa, K. Yasutomo, M. Hanibuchi, S. Akiyama, S. Sone and Y. Nishioka (2012). "Dll4-Fc, an inhibitor of Dll4-notch signaling, suppresses liver metastasis of small cell lung cancer cells through the downregulation of the NF-kappaB activity." Mol Cancer Ther **11**(12): 2578-2587.
- Laborda, J., E. A. Sausville, T. Hoffman and V. Notario (1993). "dlk, a putative mammalian homeotic gene differentially expressed in small cell lung carcinoma and neuroendocrine tumor cell line." J Biol Chem **268**(6): 3817-3820.
- Ladi, E., J. T. Nichols, W. Ge, A. Miyamoto, C. Yao, L. T. Yang, J. Boulter, Y. E. Sun, C. Kintner and G. Weinmaster (2005). "The divergent DSL ligand Dll3 does not activate Notch signaling but cell autonomously attenuates signaling induced by other DSL ligands." J Cell Biol **170**(6): 983-992.
- Lai, E. C. (2004). "Notch signaling: control of cell communication and cell fate." Development **131**(5): 965-973.
- Lai, E. C., G. A. Deblandre, C. Kintner and G. M. Rubin (2001). "Drosophila neuralized is a ubiquitin ligase that promotes the internalization and degradation of delta." Dev Cell **1**(6): 783-794.
- Lai, E. C., F. Roegiers, X. Qin, Y. N. Jan and G. M. Rubin (2005). "The ubiquitin ligase Drosophila Mind bomb promotes Notch signaling by regulating the localization and activity of Serrate and Delta." Development **132**(10): 2319-2332.
- Lange, C., S. Prenninger, P. Knuckles, V. Taylor, M. Levin and F. Calegari (2011). "The H(+) vacuolar ATPase maintains neural stem cells in the developing mouse cortex." Stem Cells Dev **20**(5): 843-850.
- Larson, R. C., P. Fisch, T. A. Larson, I. Lavenir, T. Langford, G. King and T. H. Rabbitts (1994). "T cell tumours of disparate phenotype in mice transgenic for Rbtn-2." Oncogene **9**(12): 3675-3681.
- LaVoie, M. J. and D. J. Selkoe (2003). "The Notch ligands, Jagged and Delta, are sequentially processed by alpha-secretase and presenilin/gamma-secretase and release signaling fragments." J Biol Chem **278**(36): 34427-34437.
- Le Borgne, R. (2006). "Regulation of Notch signalling by endocytosis and endosomal sorting." Curr Opin Cell Biol **18**(2): 213-222.
- Le Borgne, R., S. Remaud, S. Hamel and F. Schweisguth (2005). "Two distinct E3 ubiquitin ligases have complementary functions in the regulation of delta and serrate signaling in Drosophila." PLoS Biol **3**(4): e96.
- Le Borgne, R. and F. Schweisguth (2003). "Notch signaling: endocytosis makes delta signal better." Curr Biol **13**(7): R273-275.

- Le Borgne, R. and F. Schweisguth (2003). "Unequal segregation of Neuralized biases Notch activation during asymmetric cell division." *Dev Cell* **5**(1): 139-148.
- Le Bras, S., N. Loyer and R. Le Borgne (2011). "The multiple facets of ubiquitination in the regulation of notch signaling pathway." *Traffic* **12**(2): 149-161.
- Lebestky, T., S. H. Jung and U. Banerjee (2003). "A Serrate-expressing signaling center controls Drosophila hematopoiesis." *Genes Dev* **17**(3): 348-353.
- Lecuyer, E. and T. Hoang (2004). "SCL: from the origin of hematopoiesis to stem cells and leukemia." *Exp Hematol* **32**(1): 11-24.
- Lefort, K. and G. P. Dotto (2004). "Notch signaling in the integrated control of keratinocyte growth/differentiation and tumor suppression." *Semin Cancer Biol* **14**(5): 374-386.
- Lehar, S. M., J. Dooley, A. G. Farr and M. J. Bevan (2005). "Notch ligands Delta 1 and Jagged1 transmit distinct signals to T-cell precursors." *Blood* **105**(4): 1440-1447.
- Levesque, J. P., I. G. Winkler and J. E. Rasko (2013). "Niche therapy for stem cells: there goes the neighborhood." *Bioessays* **35**(3): 183-190.
- Li, B. X., A. K. Satoh and D. F. Ready (2007). "Myosin V, Rab11, and dRip11 direct apical secretion and cellular morphogenesis in developing Drosophila photoreceptors." *J Cell Biol* **177**(4): 659-669.
- Li, D., M. Masiero, A. H. Banham and A. L. Harris (2014). "The notch ligand JAGGED1 as a target for anti-tumor therapy." *Front Oncol* **4**: 254.
- Li, G. H., S. Y. Huang, Z. J. Kang, H. Xu and Y. M. Liang (2008). "[Research advance of notch signal in ex vivo expansion of hematopoietic progenitor cells - review]." *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* **16**(5): 1227-1231.
- Li, J. L. and A. L. Harris (2009). "Crosstalk of VEGF and Notch pathways in tumour angiogenesis: therapeutic implications." *Front Biosci (Landmark Ed)* **14**: 3094-3110.
- Li, J. L., R. C. Sainson, W. Shi, R. Leek, L. S. Harrington, M. Preusser, S. Biswas, H. Turley, E. Heikamp, J. A. Hainfellner and A. L. Harris (2007). "Delta-like 4 Notch ligand regulates tumor angiogenesis, improves tumor vascular function, and promotes tumor growth in vivo." *Cancer Res* **67**(23): 11244-11253.
- Li, K., Y. Li, W. Wu, W. R. Gordon, D. W. Chang, M. Lu, S. Scoggin, T. Fu, L. Vien, G. Histen, J. Zheng, R. Martin-Hollister, T. Duensing, S. Singh, S. C. Blacklow, Z. Yao, J. C. Aster and B. B. Zhou (2008). "Modulation of Notch signaling by antibodies specific for the extracellular negative regulatory region of NOTCH3." *J Biol Chem* **283**(12): 8046-8054.
- Li, L., I. D. Krantz, Y. Deng, A. Genin, A. B. Banta, C. C. Collins, M. Qi, B. J. Trask, W. L. Kuo, J. Cochran, T. Costa, M. E. Pierpont, E. B. Rand, D. A. Piccoli, L. Hood and N. B. Spinner (1997). "Alagille syndrome is caused by mutations in human Jagged1, which encodes a ligand for Notch1." *Nat Genet* **16**(3): 243-251.
- Li, N., K. Boyd, P. J. Dempsey and D. A. Vignali (2007). "Non-cell autonomous expression of TNF-alpha-converting enzyme ADAM17 is required for normal lymphocyte development." *J Immunol* **178**(7): 4214-4221.
- Lindberg, M. J., A. E. Popko-Scibor, M. L. Hansson and A. E. Wallberg (2010). "SUMO modification regulates the transcriptional activity of MAML1." *FASEB J* **24**(7): 2396-2404.
- Linton, P. J. and K. Dorshkind (2004). "Age-related changes in lymphocyte development and function." *Nat Immunol* **5**(2): 133-139.

- Liotta, F., R. Angeli, L. Cosmi, L. Fili, C. Manuelli, F. Frosali, B. Mazzinghi, L. Maggi, A. Pasini, V. Lisi, V. Santarlasci, L. Consoloni, M. L. Angelotti, P. Romagnani, P. Parronchi, M. Krampera, E. Maggi, S. Romagnani and F. Annunziato (2008). "Toll-like receptors 3 and 4 are expressed by human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and can inhibit their T-cell modulatory activity by impairing Notch signaling." Stem Cells **26**(1): 279-289.
- Liu, J., C. Sato, M. Cerletti and A. Wagers (2010). "Notch signaling in the regulation of stem cell self-renewal and differentiation." Curr Top Dev Biol **92**: 367-409.
- Liu, S., J. M. Bonner, S. Chanet, C. Commisso, L. C. Skwarek, F. Schweisguth and G. L. Boulianne (2012). "Functional analysis of the NHR2 domain indicates that oligomerization of Neuralized regulates ubiquitination and endocytosis of Delta during Notch signaling." Mol Cell Biol **32**(24): 4933-4945.
- Liu, S. K., S. A. Bham, E. Fokas, J. Beech, J. Im, S. Cho, A. L. Harris and R. J. Muschel (2011). "Delta-like ligand 4-notch blockade and tumor radiation response." J Natl Cancer Inst **103**(23): 1778-1798.
- Liu, W. and R. Landgraf (2015). "Phosphorylated and unphosphorylated serine 13 of CDC37 stabilize distinct interactions between its client and HSP90 binding domains." Biochemistry **54**(7): 1493-1504.
- Liu, Z., F. Fan, A. Wang, S. Zheng and Y. Lu (2014). "Dll4-Notch signaling in regulation of tumor angiogenesis." J Cancer Res Clin Oncol **140**(4): 525-536.
- Lobov, I. B., R. A. Renard, N. Papadopoulos, N. W. Gale, G. Thurston, G. D. Yancopoulos and S. J. Wiegand (2007). "Delta-like ligand 4 (Dll4) is induced by VEGF as a negative regulator of angiogenic sprouting." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(9): 3219-3224.
- Lobry, C., P. Oh and I. Aifantis (2011). "Oncogenic and tumor suppressor functions of Notch in cancer: it's NOTCH what you think." J Exp Med **208**(10): 1931-1935.
- 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.
- Lonka, L., A. Kyttala, S. Ranta, A. Jalanko and A. E. Lehesjoki (2000). "The neuronal ceroid lipofuscinosis CLN8 membrane protein is a resident of the endoplasmic reticulum." Hum Mol Genet **9**(11): 1691-1697.
- Loomes, K. M., S. A. Stevens, M. L. O'Brien, D. M. Gonzalez, M. J. Ryan, M. Segalov, N. J. Dormans, M. S. Mimoto, J. D. Gibson, W. Sewell, A. A. Schaffer, H. D. Nah, E. F. Rappaport, S. C. Pratt, S. L. Dunwoodie and K. Kusumi (2007). "Dll3 and Notch1 genetic interactions model axial segmental and craniofacial malformations of human birth defects." Dev Dyn **236**(10): 2943-2951.
- Loubery, S., C. Seum, A. Moraleda, A. Daeden, M. Furthauer and M. Gonzalez-Gaitan (2014). "Uninflatable and Notch control the targeting of sara endosomes during asymmetric division." Curr Biol **24**(18): 2142-2148.
- Louvi, A., J. F. Arboleda-Velasquez and S. Artavanis-Tsakonas (2006). "CADASIL: a critical look at a Notch disease." Dev Neurosci **28**(1-2): 5-12.
- Louvi, A. and S. Artavanis-Tsakonas (2012). "Notch and disease: a growing field." Semin Cell Dev Biol **23**(4): 473-480.
- Lozier, J., B. McCright and T. Gridley (2008). "Notch signaling regulates bile duct morphogenesis in mice." PLoS One **3**(3): e1851.

- Lu, L., X. Chen, C. W. Zhang, W. L. Yang, Y. J. Wu, L. Sun, L. M. Bai, X. S. Gu, S. Ahmed, G. S. Dawe and Z. C. Xiao (2008). "Morphological and functional characterization of predifferentiation of myelinating glia-like cells from human bone marrow stromal cells through activation of F3/Notch signaling in mouse retina." Stem Cells **26**(2): 580-590.
- Luca, V. C., K. M. Jude, N. W. Pierce, M. V. Nachury, S. Fischer and K. C. Garcia (2015). "Structural biology. Structural basis for Notch1 engagement of Delta-like 4." Science **347**(6224): 847-853.
- Ma, H., Y. Wu and H. Zhang (2015). "[Notch signaling in bone formation and related skeletal diseases]." Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi **32**(2): 274-279.
- MacGrogan, D., M. Nus and J. L. de la Pompa (2010). "Notch signaling in cardiac development and disease." Curr Top Dev Biol **92**: 333-365.
- Maeda, T., T. Merghoub, R. M. Hobbs, L. Dong, M. Maeda, J. Zakrzewski, M. R. van den Brink, A. Zelent, H. Shigematsu, K. Akashi, J. Teruya-Feldstein, G. Cattoretti and P. P. Pandolfi (2007). "Regulation of B versus T lymphoid lineage fate decision by the proto-oncogene LRF." Science **316**(5826): 860-866.
- Maekawa, Y., S. Tsukumo, S. Chiba, H. Hirai, Y. Hayashi, H. Okada, K. Kishihara and K. Yasutomo (2003). "Delta1-Notch3 interactions bias the functional differentiation of activated CD4+ T cells." Immunity **19**(4): 549-559.
- Maillard, I., L. Tu, A. Sambandam, Y. Yashiro-Ohtani, J. Millholland, K. Keeshan, O. Shestova, L. Xu, A. Bhandoola and W. S. Pear (2006). "The requirement for Notch signaling at the beta-selection checkpoint in vivo is absolute and independent of the pre-T cell receptor." J Exp Med **203**(10): 2239-2245.
- Maillard, I., A. P. Weng, A. C. Carpenter, C. G. Rodriguez, H. Sai, L. Xu, D. Allman, J. C. Aster and W. S. Pear (2004). "Mastermind critically regulates Notch-mediated lymphoid cell fate decisions." Blood **104**(6): 1696-1702.
- Majewski, J., J. A. Schwartzentruber, A. Caqueret, L. Patry, J. Marcadier, J. P. Fryns, K. M. Boycott, L. G. Ste-Marie, F. E. McKiernan, I. Marik, H. Van Esch, F. C. Consortium, J. L. Michaud and M. E. Samuels (2011). "Mutations in NOTCH2 in families with Hajdu-Cheney syndrome." Hum Mutat **32**(10): 1114-1117.
- Malecki, M. J., C. Sanchez-Irizarry, J. L. Mitchell, G. Histen, M. L. Xu, J. C. Aster and S. C. Blacklow (2006). "Leukemia-associated mutations within the NOTCH1 heterodimerization domain fall into at least two distinct mechanistic classes." Mol Cell Biol **26**(12): 4642-4651.
- Malyukova, A., T. Dohda, N. von der Lehr, S. Akhoondi, M. Corcoran, M. Heyman, C. Spruck, D. Grandt, U. Lendahl and O. Sangfelt (2007). "The tumor suppressor gene hCDC4 is frequently mutated in human T-cell acute lymphoblastic leukemia with functional consequences for Notch signaling." Cancer Res **67**(12): 5611-5616.
- Mancini, S. J., N. Mantei, A. Dumortier, U. Suter, H. R. MacDonald and F. Radtke (2005). "Jagged1-dependent Notch signaling is dispensable for hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation." Blood **105**(6): 2340-2342.
- Manilay, J. O., A. C. Anderson, C. Kang and E. A. Robey (2005). "Impairment of thymocyte development by dominant-negative Kuzbanian (ADAM-10) is rescued by the Notch ligand, delta-1." J Immunol **174**(11): 6732-6741.
- Mao, L. (2015). "NOTCH Mutations: Multiple Faces in Human Malignancies." Cancer Prev Res (Phila) **8**(4): 259-261.

- Marinangeli, C., B. Tasiaux, R. Opsomer, S. Hage, A. O. Sodero, I. Dewachter, J. N. Octave, S. O. Smith, S. N. Constantinescu and P. Kienlen-Campard (2015). "Presenilin Transmembrane Domain 8 Conserved AXXXXXXG Motifs Are Required for the Activity of the gamma-Secretase Complex." *J Biol Chem* **290**(11): 7169-7184.
- Massimiani, M., L. Vecchione, D. Piccirilli, P. Spitalieri, F. Amati, S. Salvi, S. Ferrazzani, H. Stuhlmann and L. Campagnolo (2015). "Epidermal growth factor-like domain 7 promotes migration and invasion of human trophoblast cells through activation of MAPK, PI3K and NOTCH signaling pathways." *Mol Hum Reprod* **21**(5): 435-451.
- Matsuda, M. and A. B. Chitnis (2009). "Interaction with Notch determines endocytosis of specific Delta ligands in zebrafish neural tissue." *Development* **136**(2): 197-206.
- Matsuda, Y., Y. Wakamatsu, J. Kohyama, H. Okano, K. Fukuda and S. Yasugi (2005). "Notch signaling functions as a binary switch for the determination of glandular and luminal fates of endodermal epithelium during chicken stomach development." *Development* **132**(12): 2783-2793.
- Matsuno, K., R. J. Diederich, M. J. Go, C. M. Blaumueller and S. Artavanis-Tsakonas (1995). "Deltex acts as a positive regulator of Notch signaling through interactions with the Notch ankyrin repeats." *Development* **121**(8): 2633-2644.
- Matsuno, K., M. Ito, K. Hori, F. Miyashita, S. Suzuki, N. Kishi, S. Artavanis-Tsakonas and H. Okano (2002). "Involvement of a proline-rich motif and RING-H2 finger of Deltex in the regulation of Notch signaling." *Development* **129**(4): 1049-1059.
- Mazur, P. K., H. Einwachter, M. Lee, B. Sipos, H. Nakhai, R. Rad, U. Zimmer-Strobl, L. J. Strobl, F. Radtke, G. Kloppel, R. M. Schmid and J. T. Siveke (2010). "Notch2 is required for progression of pancreatic intraepithelial neoplasia and development of pancreatic ductal adenocarcinoma." *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(30): 13438-13443.
- McDaniell, R., D. M. Warthen, P. A. Sanchez-Lara, A. Pai, I. D. Krantz, D. A. Piccoli and N. B. Spinner (2006). "NOTCH2 mutations cause Alagille syndrome, a heterogeneous disorder of the notch signaling pathway." *Am J Hum Genet* **79**(1): 169-173.
- McElhinny, A. S., J. L. Li and L. Wu (2008). "Mastermind-like transcriptional co-activators: emerging roles in regulating cross talk among multiple signaling pathways." *Oncogene* **27**(38): 5138-5147.
- McGill, M. A., S. E. Dho, G. Weinmaster and C. J. McGlade (2009). "Numb regulates post-endocytic trafficking and degradation of Notch1." *J Biol Chem* **284**(39): 26427-26438.
- McGuire, E. A., C. E. Rintoul, G. M. Sclar and S. J. Korsmeyer (1992). "Thymic overexpression of Ttg-1 in transgenic mice results in T-cell acute lymphoblastic leukemia/lymphoma." *Mol Cell Biol* **12**(9): 4186-4196.
- McMillan, B. J., B. Schnute, N. Ohlenhard, B. Zimmerman, L. Miles, N. Beglova, T. Klein and S. C. Blacklow (2015). "A tail of two sites: a bipartite mechanism for recognition of notch ligands by mind bomb E3 ligases." *Mol Cell* **57**(5): 912-924.
- Medyouf, H., S. Gusscott, H. Wang, J. C. Tseng, C. Wai, O. Nemirovsky, A. Trumpp, F. Pflumio, J. Carboni, M. Gottardis, M. Pollak, A. L. Kung, J. C. Aster, M. Holzenberger and A. P. Weng (2011). "High-level IGF1R expression is required for leukemia-initiating cell activity in T-ALL and is supported by Notch signaling." *J Exp Med* **208**(9): 1809-1822.
- Meloty-Kapella, L., B. Shergill, J. Kuon, E. Botvinick and G. Weinmaster (2012). "Notch ligand endocytosis generates mechanical pulling force dependent on dynamin, epsins, and actin." *Dev Cell* **22**(6): 1299-1312.

- Meng, H., X. Zhang, K. D. Hankenson and M. M. Wang (2009). "Thrombospondin 2 potentiates notch3/jagged1 signaling." J Biol Chem **284**(12): 7866-7874.
- Minamizato, T., K. Sakamoto, T. Liu, H. Kokubo, K. Katsube, B. Perbal, S. Nakamura and A. Yamaguchi (2007). "CCN3/NOV inhibits BMP-2-induced osteoblast differentiation by interacting with BMP and Notch signaling pathways." Biochem Biophys Res Commun **354**(2): 567-573.
- Minuzzo, S., V. Agnusdei, I. Pusceddu, M. Pinazza, L. Moserle, M. Masiero, E. Rossi, M. Crescenzi, T. Hoey, M. Ponzoni, A. Amadori and S. Indraccolo (2015). "DLL4 regulates NOTCH signaling and growth of T acute lymphoblastic leukemia cells in NOD/SCID mice." Carcinogenesis **36**(1): 115-121.
- Mittal, S., D. Subramanyam, D. Dey, R. V. Kumar and A. Rangarajan (2009). "Cooperation of Notch and Ras/MAPK signaling pathways in human breast carcinogenesis." Mol Cancer **8**: 128.
- Miyamoto, A., R. Lau, P. W. Hein, J. M. Shipley and G. Weinmaster (2006). "Microfibrillar proteins MAGP-1 and MAGP-2 induce Notch1 extracellular domain dissociation and receptor activation." J Biol Chem **281**(15): 10089-10097.
- Miyata, Y., H. Nakamoto and L. Neckers (2013). "The therapeutic target Hsp90 and cancer hallmarks." Curr Pharm Des **19**(3): 347-365.
- Mizuhara, E., T. Nakatani, Y. Minaki, Y. Sakamoto, Y. Ono and Y. Takai (2005). "MAGI1 recruits Dll1 to cadherin-based adherens junctions and stabilizes it on the cell surface." J Biol Chem **280**(28): 26499-26507.
- Mlodzik, M., N. E. Baker and G. M. Rubin (1990). "Isolation and expression of scabrous, a gene regulating neurogenesis in Drosophila." Genes Dev **4**(11): 1848-1861.
- Moellering, R. E., M. Cornejo, T. N. Davis, C. Del Bianco, J. C. Aster, S. C. Blacklow, A. L. Kung, D. G. Gilliland, G. L. Verdine and J. E. Bradner (2009). "Direct inhibition of the NOTCH transcription factor complex." Nature **462**(7270): 182-188.
- Mohamed, S. A., Z. Aherrahrou, H. Liptau, A. W. Erasmi, C. Hagemann, S. Wrobel, K. Borzym, H. Schunkert, H. H. Sievers and J. Erdmann (2006). "Novel missense mutations (p.T596M and p.P1797H) in NOTCH1 in patients with bicuspid aortic valve." Biochem Biophys Res Commun **345**(4): 1460-1465.
- Mohtashami, M., D. K. Shah, H. Nakase, K. Kianizad, H. T. Petrie and J. C. Zuniga-Pflucker (2010). "Direct comparison of Dll1- and Dll4-mediated Notch activation levels shows differential lymphomyeloid lineage commitment outcomes." J Immunol **185**(2): 867-876.
- Montagne, C. and M. Gonzalez-Gaitan (2014). "Sara endosomes and the asymmetric division of intestinal stem cells." Development **141**(10): 2014-2023.
- Moretti, J. and C. Brou (2013). "Ubiquitinations in the notch signaling pathway." Int J Mol Sci **14**(3): 6359-6381.
- Moretti, J., P. Chastagner, S. Gastaldello, S. F. Heuss, A. M. Dirac, R. Bernards, M. G. Masucci, A. Israel and C. Brou (2010). "The translation initiation factor 3f (eIF3f) exhibits a deubiquitinase activity regulating Notch activation." PLoS Biol **8**(11): e1000545.
- Moretti, J., P. Chastagner, C. C. Liang, M. A. Cohn, A. Israel and C. Brou (2012). "The ubiquitin-specific protease 12 (USP12) is a negative regulator of notch signaling acting on notch receptor trafficking toward degradation." J Biol Chem **287**(35): 29429-29441.

- Morgan, Thomas Hunt (1917). "The theory of the gene". The American Naturalist **51**(609): 513–544. doi:10.1086/279629.
- Morgan, Thomas Hunt (1928). "The theory of the gene (revised ed.)". Yale University Press. pp. 77–81. ISBN 0-8240-1384-0.
- Morrisette, J. D., R. P. Colliton and N. B. Spinner (2001). "Defective intracellular transport and processing of JAG1 missense mutations in Alagille syndrome." Hum Mol Genet **10**(4): 405-413.
- Mukherjee, A., A. Veraksa, A. Bauer, C. Rosse, J. Camonis and S. Artavanis-Tsakonas (2005). "Regulation of Notch signalling by non-visual beta-arrestin." Nat Cell Biol **7**(12): 1191-1201.
- Mullendore, M. E., J. B. Koorstra, Y. M. Li, G. J. Offerhaus, X. Fan, C. M. Henderson, W. Matsui, C. G. Eberhart, A. Maitra and G. Feldmann (2009). "Ligand-dependent Notch signaling is involved in tumor initiation and tumor maintenance in pancreatic cancer." Clin Cancer Res **15**(7): 2291-2301.
- Muller, J., N. A. Rana, K. Serth, S. Kakuda, R. S. Haltiwanger and A. Gossler (2014). "O-fucosylation of the notch ligand mDLL1 by POFUT1 is dispensable for ligand function." PLoS One **9**(2): e88571.
- Mummery-Widmer, J. L., M. Yamazaki, T. Stoeger, M. Novatchkova, S. Bhalerao, D. Chen, G. Dietzl, B. J. Dickson and J. A. Knoblich (2009). "Genome-wide analysis of Notch signalling in Drosophila by transgenic RNAi." Nature **458**(7241): 987-992.
- Muraguchi, T., Y. Takegami, T. Ohtsuka, S. Kitajima, E. P. Chandana, A. Omura, T. Miki, R. Takahashi, N. Matsumoto, A. Ludwig, M. Noda and C. Takahashi (2007). "RECK modulates Notch signaling during cortical neurogenesis by regulating ADAM10 activity." Nat Neurosci **10**(7): 838-845.
- Murata, A., K. Okuyama, S. Sakano, M. Kajiki, T. Hirata, H. Yagita, J. C. Zuniga-Pflucker, K. Miyake, S. Akashi-Takamura, S. Moriwaki, S. Niida, M. Yoshino and S. Hayashi (2010). "A Notch ligand, Delta-like 1 functions as an adhesion molecule for mast cells." J Immunol **185**(7): 3905-3912.
- Murphy, G. (2011). "Tissue inhibitors of metalloproteinases." Genome Biol **12**(11): 233.
- Musse, A. A., L. Meloty-Kapella and G. Weinmaster (2012). "Notch ligand endocytosis: mechanistic basis of signaling activity." Semin Cell Dev Biol **23**(4): 429-436.
- Nanda, N., M. Bao, H. Lin, K. Clauser, L. Komuves, T. Quertermous, P. B. Conley, D. R. Phillips and M. J. Hart (2005). "Platelet endothelial aggregation receptor 1 (PEAR1), a novel epidermal growth factor repeat-containing transmembrane receptor, participates in platelet contact-induced activation." J Biol Chem **280**(26): 24680-24689.
- Nichol, D., C. Shawber, M. J. Fitch, K. Bambino, A. Sharma, J. Kitajewski and H. Stuhlmann (2010). "Impaired angiogenesis and altered Notch signaling in mice overexpressing endothelial Egl7." Blood **116**(26): 6133-6143.
- Nichols, J. T., A. Miyamoto, S. L. Olsen, B. D'Souza, C. Yao and G. Weinmaster (2007). "DSL ligand endocytosis physically dissociates Notch1 heterodimers before activating proteolysis can occur." J Cell Biol **176**(4): 445-458.
- Nichols, J. T., A. Miyamoto and G. Weinmaster (2007). "Notch signaling--constantly on the move." Traffic **8**(8): 959-969.
- Nicolas, M., A. Wolfer, K. Raj, J. A. Kummer, P. Mill, M. van Noort, C. C. Hui, H. Clevers, G. P. Dotto and F. Radtke (2003). "Notch1 functions as a tumor suppressor in mouse skin." Nat Genet **33**(3): 416-421.

- Noguera-Troise, I., C. Daly, N. J. Papadopoulos, S. Coetzee, P. Boland, N. W. Gale, H. C. Lin, G. D. Yancopoulos and G. Thurston (2007). "Blockade of Dll4 inhibits tumour growth by promoting non-productive angiogenesis." Novartis Found Symp **283**: 106-120; discussion 121-105, 238-141.
- Nueda, M. L., V. Baladron, B. Sanchez-Solana, M. A. Ballesteros and J. Laborda (2007). "The EGF-like protein dlk1 inhibits notch signaling and potentiates adipogenesis of mesenchymal cells." J Mol Biol **367**(5): 1281-1293.
- O'Connor-Giles, K. M. and J. B. Skeath (2003). "Numb inhibits membrane localization of Sanpodo, a four-pass transmembrane protein, to promote asymmetric divisions in *Drosophila*." Dev Cell **5**(2): 231-243.
- O'Neil, J., J. Calvo, K. McKenna, V. Krishnamoorthy, J. C. Aster, C. H. Bassing, F. W. Alt, M. Kelliher and A. T. Look (2006). "Activating Notch1 mutations in mouse models of T-ALL." Blood **107**(2): 781-785.
- O'Neil, J., J. Grim, P. Strack, S. Rao, D. Tibbitts, C. Winter, J. Hardwick, M. Welcker, J. P. Meijerink, R. Pieters, G. Draetta, R. Sears, B. E. Clurman and A. T. Look (2007). "FBW7 mutations in leukemic cells mediate NOTCH pathway activation and resistance to gamma-secretase inhibitors." J Exp Med **204**(8): 1813-1824.
- Oberg, C., J. Li, A. Pauley, E. Wolf, M. Gurney and U. Lendahl (2001). "The Notch intracellular domain is ubiquitinated and negatively regulated by the mammalian Sel-10 homolog." J Biol Chem **276**(38): 35847-35853.
- Oda, T., A. G. Elkahlon, B. L. Pike, K. Okajima, I. D. Krantz, A. Genin, D. A. Piccoli, P. S. Meltzer, N. B. Spinner, F. S. Collins and S. C. Chandrasekharappa (1997). "Mutations in the human Jagged1 gene are responsible for Alagille syndrome." Nat Genet **16**(3): 235-242.
- Ohata, S., R. Aoki, S. Kinoshita, M. Yamaguchi, S. Tsuruoka-Kinoshita, H. Tanaka, H. Wada, S. Watabe, T. Tsuboi, I. Masai and H. Okamoto (2011). "Dual roles of Notch in regulation of apically restricted mitosis and apicobasal polarity of neuroepithelial cells." Neuron **69**(2): 215-230.
- Okajima, T. and K. D. Irvine (2002). "Regulation of notch signaling by o-linked fucose." Cell **111**(6): 893-904.
- Orr, B., O. C. Grace, G. Vanpoucke, G. R. Ashley and A. A. Thomson (2009). "A role for notch signaling in stromal survival and differentiation during prostate development." Endocrinology **150**(1): 463-472.
- Osanyingbemi-Obidi, J., I. Dobromilskaya, P. B. Illei, C. L. Hann and C. M. Rudin (2011). "Notch signaling contributes to lung cancer clonogenic capacity in vitro but may be circumvented in tumorigenesis in vivo." Mol Cancer Res **9**(12): 1746-1754.
- Ossipova, O., J. Ezan and S. Y. Sokol (2009). "PAR-1 phosphorylates Mind bomb to promote vertebrate neurogenesis." Dev Cell **17**(2): 222-233.
- Oswald, F., M. Winkler, Y. Cao, K. Astrahantseff, S. Bourteele, W. Knochel and T. Borggrefe (2005). "RBP-Jkappa/SHARP recruits CtIP/CtBP corepressors to silence Notch target genes." Mol Cell Biol **25**(23): 10379-10390.
- Ota, A. and Y. Wang (2012). "Cdc37/Hsp90 protein-mediated regulation of IRE1alpha protein activity in endoplasmic reticulum stress response and insulin synthesis in INS-1 cells." J Biol Chem **287**(9): 6266-6274.

- Overstreet, E., E. Fitch and J. A. Fischer (2004). "Fat facets and Liquid facets promote Delta endocytosis and Delta signaling in the signaling cells." Development **131**(21): 5355-5366.
- Palmer, W. H., D. Jia and W. M. Deng (2014). "Cis-interactions between Notch and its ligands block ligand-independent Notch activity." Elife **3**.
- Pang, R. T., C. O. Leung, T. M. Ye, W. Liu, P. C. Chiu, K. K. Lam, K. F. Lee and W. S. Yeung (2010). "MicroRNA-34a suppresses invasion through downregulation of Notch1 and Jagged1 in cervical carcinoma and choriocarcinoma cells." Carcinogenesis **31**(6): 1037-1044.
- Panin, V. M., L. Shao, L. Lei, D. J. Moloney, K. D. Irvine and R. S. Haltiwanger (2002). "Notch ligands are substrates for protein O-fucosyltransferase-1 and Fringe." J Biol Chem **277**(33): 29945-29952.
- Pannequin, J., C. Bonnans, N. Delaunay, J. Ryan, J. F. Bourgaux, D. Joubert and F. Hollande (2009). "The wnt target jagged-1 mediates the activation of notch signaling by progastrin in human colorectal cancer cells." Cancer Res **69**(15): 6065-6073.
- Park, S., C. Lee, P. Sabharwal, M. Zhang, C. L. Meyers and S. Sockanathan (2013). "GDE2 promotes neurogenesis by glycosylphosphatidylinositol-anchor cleavage of RECK." Science **339**(6117): 324-328.
- Parks, A. L., K. M. Klueg, J. R. Stout and M. A. Muskavitch (2000). "Ligand endocytosis drives receptor dissociation and activation in the Notch pathway." Development **127**(7): 1373-1385.
- Parks, A. L., J. R. Stout, S. B. Shepard, K. M. Klueg, A. A. Dos Santos, T. R. Parody, M. Vaskova and M. A. Muskavitch (2006). "Structure-function analysis of delta trafficking, receptor binding and signaling in Drosophila." Genetics **174**(4): 1947-1961.
- Pavlopoulos, E., C. Pitsouli, K. M. Klueg, M. A. Muskavitch, N. K. Moschonas and C. Delidakis (2001). "neuralized Encodes a peripheral membrane protein involved in delta signaling and endocytosis." Dev Cell **1**(6): 807-816.
- Pedrosa, A. R., A. Trindade, A. C. Fernandes, C. Carvalho, J. Gigante, A. T. Tavares, R. Dieguez-Hurtado, H. Yagita, R. H. Adams and A. Duarte (2015). "Endothelial JAGGED1 antagonizes dll4 regulation of endothelial branching and promotes vascular maturation downstream of dll4/notch1." Arterioscler Thromb Vasc Biol **35**(5): 1134-1146.
- Penton, A. L., L. D. Leonard and N. B. Spinner (2012). "Notch signaling in human development and disease." Semin Cell Dev Biol **23**(4): 450-457.
- Perez, L., M. Milan, S. Bray and S. M. Cohen (2005). "Ligand-binding and signaling properties of the Ax[M1] form of Notch." Mech Dev **122**(4): 479-486.
- Petrie, H. T. and J. C. Zuniga-Pflucker (2007). "Zoned out: functional mapping of stromal signaling microenvironments in the thymus." Annu Rev Immunol **25**: 649-679.
- Pintar, A., A. De Biasio, M. Popovic, N. Ivanova and S. Pongor (2007). "The intracellular region of Notch ligands: does the tail make the difference?" Biol Direct **2**: 19.
- Pitsouli, C. and C. Delidakis (2005). "The interplay between DSL proteins and ubiquitin ligases in Notch signaling." Development **132**(18): 4041-4050.
- Porritt, H. E., K. Gordon and H. T. Petrie (2003). "Kinetics of steady-state differentiation and mapping of intrathymic-signaling environments by stem cell transplantation in nonirradiated mice." J Exp Med **198**(6): 957-962.

- Poulin, G., Y. Dong, A. G. Fraser, N. A. Hopper and J. Ahringer (2005). "Chromatin regulation and sumoylation in the inhibition of Ras-induced vulval development in *Caenorhabditis elegans*." *EMBO J* **24**(14): 2613-2623.
- Pournara, A., T. Holmlund, Y. Lu, R. Ceder, M. Putnik, R. Grafstrom, M. Vahter and A. E. Wallberg (2014). "Arsenic-induced suppression of kidney cell proliferation and the transcriptional coregulator MAML1." *Metallomics* **6**(3): 498-504.
- Powell, P. A., C. Wesley, S. Spencer and R. L. Cagan (2001). "Scabrous complexes with Notch to mediate boundary formation." *Nature* **409**(6820): 626-630.
- Priess, J. R., H. Schnabel and R. Schnabel (1987). "The *glp-1* locus and cellular interactions in early *C. elegans* embryos." *Cell* **51**(4): 601-611.
- Puente, X. S., M. Pinyol, V. Quesada, L. Conde, G. R. Ordonez, N. Villamor, G. Escaramis, P. Jares, S. Bea, M. Gonzalez-Diaz, L. Bassaganyas, T. Baumann, M. Juan, M. Lopez-Guerra, D. Colomer, J. M. Tubio, C. Lopez, A. Navarro, C. Tornador, M. Aymerich, M. Rozman, J. M. Hernandez, D. A. Puente, J. M. Freije, G. Velasco, A. Gutierrez-Fernandez, D. Costa, A. Carrio, S. Guijarro, A. Enjuanes, L. Hernandez, J. Yague, P. Nicolas, C. M. Romeo-Casabona, H. Himmelbauer, E. Castillo, J. C. Dohm, S. de Sanjose, M. A. Piris, E. de Alava, J. San Miguel, R. Royo, J. L. Gelpi, D. Torrents, M. Orozco, D. G. Pisano, A. Valencia, R. Guigo, M. Bayes, S. Heath, M. Gut, P. Klatt, J. Marshall, K. Raine, L. A. Stebbings, P. A. Futreal, M. R. Stratton, P. J. Campbell, I. Gut, A. Lopez-Guillermo, X. Estivill, E. Montserrat, C. Lopez-Otin and E. Campo (2011). "Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia." *Nature* **475**(7354): 101-105.
- Pui, J. C., D. Allman, L. Xu, S. DeRocco, F. G. Karnell, S. Bakkour, J. Y. Lee, T. Kadesch, R. R. Hardy, J. C. Aster and W. S. Pear (1999). "Notch1 expression in early lymphopoiesis influences B versus T lineage determination." *Immunity* **11**(3): 299-308.
- Radtke, F., H. R. MacDonald and F. Tacchini-Cottier (2013). "Regulation of innate and adaptive immunity by Notch." *Nat Rev Immunol* **13**(6): 427-437.
- Radtke, F. and K. Raj (2003). "The role of Notch in tumorigenesis: oncogene or tumour suppressor?" *Nat Rev Cancer* **3**(10): 756-767.
- Radtke, F., A. Wilson, G. Stark, M. Bauer, J. van Meerwijk, H. R. MacDonald and M. Aguet (1999). "Deficient T cell fate specification in mice with an induced inactivation of Notch1." *Immunity* **10**(5): 547-558.
- Raffetseder, U., T. Rauen, P. Boor, T. Ostendorf, L. Hanssen, J. Floege, A. En-Nia, S. Djudjaj, B. C. Frye and P. R. Mertens (2011). "Extracellular YB-1 blockade in experimental nephritis upregulates Notch-3 receptor expression and signaling." *Nephron Exp Nephrol* **118**(4): e100-108.
- Rajan, A., A. C. Tien, C. M. Haueter, K. L. Schulze and H. J. Bellen (2009). "The Arp2/3 complex and WASp are required for apical trafficking of Delta into microvilli during cell fate specification of sensory organ precursors." *Nat Cell Biol* **11**(7): 815-824.
- Rauen, T., U. Raffetseder, B. C. Frye, S. Djudjaj, P. J. Muhlenberg, F. Eitner, U. Lendahl, J. Bernhagen, S. Dooley and P. R. Mertens (2009). "YB-1 acts as a ligand for Notch-3 receptors and modulates receptor activation." *J Biol Chem* **284**(39): 26928-26940.
- Ray, W. J., M. Yao, J. Mumm, E. H. Schroeter, P. Saftig, M. Wolfe, D. J. Selkoe, R. Kopan and A. M. Goate (1999). "Cell surface presenilin-1 participates in the gamma-secretase-like proteolysis of Notch." *J Biol Chem* **274**(51): 36801-36807.

- Real, P. J. and A. A. Ferrando (2009). "NOTCH inhibition and glucocorticoid therapy in T-cell acute lymphoblastic leukemia." *Leukemia* **23**(8): 1374-1377.
- 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.
- Redeker, C., K. Schuster-Gossler, E. Kremmer and A. Gossler (2013). "Normal development in mice over-expressing the intracellular domain of DLL1 argues against reverse signaling by DLL1 in vivo." *PLoS One* **8**(10): e79050.
- Regan, J. and F. Long (2013). "Notch signaling and bone remodeling." *Curr Osteoporos Rep* **11**(2): 126-129.
- Rhyu, M. S., L. Y. Jan and Y. N. Jan (1994). "Asymmetric distribution of numb protein during division of the sensory organ precursor cell confers distinct fates to daughter cells." *Cell* **76**(3): 477-491.
- Richards, G. S. and B. M. Degnan (2009). "The dawn of developmental signaling in the metazoa." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **74**: 81-90.
- Richter, S., P. L. Bedard, E. X. Chen, B. A. Clarke, B. Tran, S. J. Hotte, A. Stathis, H. W. Hirte, A. R. Razak, M. Reedijk, Z. Chen, B. Cohen, W. J. Zhang, L. Wang, S. P. Ivy, M. J. Moore, A. M. Oza, L. L. Siu and E. McWhirter (2014). "A phase I study of the oral gamma secretase inhibitor R04929097 in combination with gemcitabine in patients with advanced solid tumors (PHL-078/CTEP 8575)." *Invest New Drugs* **32**(2): 243-249.
- Ridgway, J., G. Zhang, Y. Wu, S. Stawicki, W. C. Liang, Y. Chanthery, J. Kowalski, R. J. Watts, C. Callahan, I. Kasman, M. Singh, M. Chien, C. Tan, J. A. Hongo, F. de Sauvage, G. Plowman and M. Yan (2006). "Inhibition of Dll4 signalling inhibits tumour growth by deregulating angiogenesis." *Nature* **444**(7122): 1083-1087.
- Rishikaysh, P., K. Dev, D. Diaz, W. M. Qureshi, S. Filip and J. Mokry (2014). "Signaling involved in hair follicle morphogenesis and development." *Int J Mol Sci* **15**(1): 1647-1670.
- Robert-Moreno, A., L. Espinosa, J. L. de la Pompa and A. Bigas (2005). "RBPjkappa-dependent Notch function regulates Gata2 and is essential for the formation of intra-embryonic hematopoietic cells." *Development* **132**(5): 1117-1126.
- Roca, C. and R. H. Adams (2007). "Regulation of vascular morphogenesis by Notch signaling." *Genes Dev* **21**(20): 2511-2524.
- Rodilla, V., A. Villanueva, A. Obrador-Hevia, A. Robert-Moreno, V. Fernandez-Majada, A. Grilli, N. Lopez-Bigas, N. Bellora, M. M. Alba, F. Torres, M. Dunach, X. Sanjuan, S. Gonzalez, T. Gridley, G. Capella, A. Bigas and L. Espinosa (2009). "Jagged1 is the pathological link between Wnt and Notch pathways in colorectal cancer." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(15): 6315-6320.
- Rothenberg, E. V., J. E. Moore and M. A. Yui (2008). "Launching the T-cell-lineage developmental programme." *Nat Rev Immunol* **8**(1): 9-21.
- Rubio-Aliaga, I., G. K. Przemec, H. Fuchs, V. Gailus-Durner, T. Adler, W. Hans, M. Horsch, B. Rathkolb, J. Rozman, A. Schrewe, S. Wagner, S. M. Hoelter, L. Becker, T. Klopstock, W. Wurst, E. Wolf, M. Klingenspor, B. T. Ivandic, D. H. Busch, J. Beckers and M. Hrabe de Angelis (2009). "Dll1 haploinsufficiency in adult mice leads to a complex phenotype affecting metabolic and immunological processes." *PLoS One* **4**(6): e6054.

- Sahebjam, S., P. L. Bedard, V. Castonguay, Z. Chen, M. Reedijk, G. Liu, B. Cohen, W. J. Zhang, B. Clarke, T. Zhang, S. Kamel-Reid, H. Chen, S. P. Ivy, A. R. Razak, A. M. Oza, E. X. Chen, H. W. Hirte, A. McGarrity, L. Wang, L. L. Siu and S. J. Hotte (2013). "A phase I study of the combination of ro4929097 and cediranib in patients with advanced solid tumours (PJC-004/NCI 8503)." *Br J Cancer* **109**(4): 943-949.
- Sainson, R. C. and A. L. Harris (2008). "Regulation of angiogenesis by homotypic and heterotypic notch signalling in endothelial cells and pericytes: from basic research to potential therapies." *Angiogenesis* **11**(1): 41-51.
- Saint Just Ribeiro, M. and A. E. Wallberg (2009). "Transcriptional mechanisms by the coregulator MAML1." *Curr Protein Pept Sci* **10**(6): 570-576.
- Saj, A., Z. Arziman, D. Stempfle, W. van Belle, U. Sauder, T. Horn, M. Durrenberger, R. Paro, M. Boutros and G. Merdes (2010). "A combined ex vivo and in vivo RNAi screen for notch regulators in Drosophila reveals an extensive notch interaction network." *Dev Cell* **18**(5): 862-876.
- Sakamoto, K., S. Yamaguchi, R. Ando, A. Miyawaki, Y. Kabasawa, M. Takagi, C. L. Li, B. Perbal and K. Katsube (2002). "The nephroblastoma overexpressed gene (NOV/ccn3) protein associates with Notch1 extracellular domain and inhibits myoblast differentiation via Notch signaling pathway." *J Biol Chem* **277**(33): 29399-29405.
- Sakata, T., H. Sakaguchi, L. Tsuda, A. Higashitani, T. Aigaki, K. Matsuno and S. Hayashi (2004). "Drosophila Nedd4 regulates endocytosis of notch and suppresses its ligand-independent activation." *Curr Biol* **14**(24): 2228-2236.
- Sansone, P., G. Storci, S. Tavolari, T. Guarnieri, C. Giovannini, M. Taffurelli, C. Ceccarelli, D. Santini, P. Paterini, K. B. Marcu, P. Chieco and M. Bonafe (2007). "IL-6 triggers malignant features in mammospheres from human ductal breast carcinoma and normal mammary gland." *J Clin Invest* **117**(12): 3988-4002.
- Scehnet, J. S., W. Jiang, S. R. Kumar, V. Krasnoperov, A. Trindade, R. Benedito, D. Djokovic, C. Borges, E. J. Ley, A. Duarte and P. S. Gill (2007). "Inhibition of Dll4-mediated signaling induces proliferation of immature vessels and results in poor tissue perfusion." *Blood* **109**(11): 4753-4760.
- Schmidt, M. H., F. Bicker, I. Nikolic, J. Meister, T. Babuke, S. Picuric, W. Muller-Esterl, K. H. Plate and I. Dikic (2009). "Epidermal growth factor-like domain 7 (EGFL7) modulates Notch signalling and affects neural stem cell renewal." *Nat Cell Biol* **11**(7): 873-880.
- Schmitt, T. M., M. Ciofani, H. T. Petrie and J. C. Zuniga-Pflucker (2004). "Maintenance of T cell specification and differentiation requires recurrent notch receptor-ligand interactions." *J Exp Med* **200**(4): 469-479.
- Schmitt, T. M., R. F. de Pooter, M. A. Gronski, S. K. Cho, P. S. Ohashi and J. C. Zuniga-Pflucker (2004). "Induction of T cell development and establishment of T cell competence from embryonic stem cells differentiated in vitro." *Nat Immunol* **5**(4): 410-417.
- Schmitt, T. M. and J. C. Zuniga-Pflucker (2002). "Induction of T cell development from hematopoietic progenitor cells by delta-like-1 in vitro." *Immunity* **17**(6): 749-756.
- Schneider, M., T. Troost, F. Grawe, A. Martinez-Arias and T. Klein (2013). "Activation of Notch in lgd mutant cells requires the fusion of late endosomes with the lysosome." *J Cell Sci* **126**(Pt 2): 645-656.

- Schweisguth, F. and J. W. Posakony (1994). "Antagonistic activities of Suppressor of Hairless and Hairless control alternative cell fates in the *Drosophila* adult epidermis." Development **120**(6): 1433-1441.
- Serth, K., K. Schuster-Gossler, E. Kremmer, B. Hansen, B. Marohn-Kohn and A. Gossler (2015). "O-Fucosylation of DLL3 Is Required for Its Function during Somitogenesis." PLoS One **10**(4): e0123776.
- Sestan, N., S. Artavanis-Tsakonas and P. Rakic (1999). "Contact-dependent inhibition of cortical neurite growth mediated by notch signaling." Science **286**(5440): 741-746.
- Sethi, M. K., F. F. Buettner, V. B. Krylov, H. Takeuchi, N. E. Nifantiev, R. S. Haltiwanger, R. Gerardy-Schahn and H. Bakker (2010). "Identification of glycosyltransferase 8 family members as xylosyltransferases acting on O-glycosylated notch epidermal growth factor repeats." J Biol Chem **285**(3): 1582-1586.
- Shah, D. K., M. Mohtashami and J. C. Zuniga-Pflucker (2012). "Role of recycling, Mindbomb1 association, and exclusion from lipid rafts of delta-like 4 for effective Notch signaling to drive T cell development." J Immunol **189**(12): 5797-5808.
- Shah, D. K. and J. C. Zuniga-Pflucker (2012). "Notch receptor-ligand interactions during T cell development, a ligand endocytosis-driven mechanism." Curr Top Microbiol Immunol **360**: 19-46.
- Shao, H., Q. Huang and Z. J. Liu (2012). "Targeting Notch signaling for cancer therapeutic intervention." Adv Pharmacol **65**: 191-234.
- Sharma, A., A. Rangarajan and R. R. Dighe (2013). "Antibodies against the extracellular domain of human Notch1 receptor reveal the critical role of epidermal-growth-factor-like repeats 25-26 in ligand binding and receptor activation." Biochem J **449**(2): 519-530.
- Sheng, M. and C. Sala (2001). "PDZ domains and the organization of supramolecular complexes." Annu Rev Neurosci **24**: 1-29.
- Shergill, B., L. Meloty-Kapella, A. A. Musse, G. Weinmaster and E. Botvinick (2012). "Optical tweezers studies on Notch: single-molecule interaction strength is independent of ligand endocytosis." Dev Cell **22**(6): 1313-1320.
- 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.
- Shimizu, K., S. Chiba, T. Saito, T. Takahashi, K. Kumano, Y. Hamada and H. Hirai (2002). "Integrity of intracellular domain of Notch ligand is indispensable for cleavage required for release of the Notch2 intracellular domain." EMBO J **21**(3): 294-302.
- Simpson, M. A., M. D. Irving, E. Asilmaz, M. J. Gray, D. Dafou, F. V. Elmslie, S. Mansour, S. E. Holder, C. E. Brain, B. K. Burton, K. H. Kim, R. M. Pauli, S. Aftimos, H. Stewart, C. A. Kim, M. Holder-Espinasse, S. P. Robertson, W. M. Drake and R. C. Trembath (2011). "Mutations in NOTCH2 cause Hajdu-Cheney syndrome, a disorder of severe and progressive bone loss." Nat Genet **43**(4): 303-305.
- Six, E., D. Ndiaye, Y. Laabi, C. Brou, N. Gupta-Rossi, A. Israel and F. Logeat (2003). "The Notch ligand Delta1 is sequentially cleaved by an ADAM protease and gamma-secretase." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(13): 7638-7643.

- Six, E. M., D. Ndiaye, G. Sauer, Y. Laabi, R. Athman, A. Cumano, C. Brou, A. Israel and F. Logeat (2004). "The notch ligand Delta1 recruits Dlg1 at cell-cell contacts and regulates cell migration." *J Biol Chem* **279**(53): 55818-55826.
- Smas, C. M. and H. S. Sul (1993). "Pref-1, a protein containing EGF-like repeats, inhibits adipocyte differentiation." *Cell* **73**(4): 725-734.
- Song, R., Y. W. Kim, B. K. Koo, H. W. Jeong, M. J. Yoon, K. J. Yoon, D. J. Jun, S. K. Im, J. Shin, M. P. Kong, K. T. Kim, K. Yoon and Y. Y. Kong (2008). "Mind bomb 1 in the lymphopoietic niches is essential for T and marginal zone B cell development." *J Exp Med* **205**(11): 2525-2536.
- Song, R., B. K. Koo, K. J. Yoon, M. J. Yoon, K. W. Yoo, H. T. Kim, H. J. Oh, Y. Y. Kim, J. K. Han, C. H. Kim and Y. Y. Kong (2006). "Neuralized-2 regulates a Notch ligand in cooperation with Mind bomb-1." *J Biol Chem* **281**(47): 36391-36400.
- Song, W., P. Nadeau, M. Yuan, X. Yang, J. Shen and B. A. Yankner (1999). "Proteolytic release and nuclear translocation of Notch-1 are induced by presenilin-1 and impaired by pathogenic presenilin-1 mutations." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(12): 6959-6963.
- Sorensen, E. B. and S. D. Conner (2010). "gamma-secretase-dependent cleavage initiates notch signaling from the plasma membrane." *Traffic* **11**(9): 1234-1245.
- Sparrow, D. B., G. Chapman, M. A. Wouters, N. V. Whittock, S. Ellard, D. Fatkin, P. D. Turnpenny, K. Kusumi, D. Silience and S. L. Dunwoodie (2006). "Mutation of the LUNATIC FRINGE gene in humans causes spondylocostal dysostosis with a severe vertebral phenotype." *Am J Hum Genet* **78**(1): 28-37.
- Sparrow, D. B., E. A. Faqeih, B. Sallout, A. Alswaid, F. Ababneh, M. Al-Sayed, H. Rukban, W. M. Eyaid, R. Kageyama, S. Ellard, P. D. Turnpenny and S. L. Dunwoodie (2013). "Mutation of HES7 in a large extended family with spondylocostal dysostosis and dextrocardia with situs inversus." *Am J Med Genet A* **161A**(9): 2244-2249.
- Sprinzak, D., A. Lakhanpal, L. Lebon, L. A. Santat, M. E. Fontes, G. A. Anderson, J. Garcia-Ojalvo and M. B. Elowitz (2010). "Cis-interactions between Notch and Delta generate mutually exclusive signalling states." *Nature* **465**(7294): 86-90.
- St-Pierre, C., S. Brochu, J. R. Vanegas, M. Dumont-Lagace, S. Lemieux and C. Perreault (2013). "Transcriptome sequencing of neonatal thymic epithelial cells." *Sci Rep* **3**: 1860.
- Stanley, P. and T. Okajima (2010). "Roles of glycosylation in Notch signaling." *Curr Top Dev Biol* **92**: 131-164.
- Staub, O. and D. Rotin (2006). "Role of ubiquitylation in cellular membrane transport." *Physiol Rev* **86**(2): 669-707.
- Stransky, N., A. M. Egloff, A. D. Tward, A. D. Kostic, K. Cibulskis, A. Sivachenko, G. V. Kryukov, M. S. Lawrence, C. Sougnez, A. McKenna, E. Shefler, A. H. Ramos, P. Stojanov, S. L. Carter, D. Voet, M. L. Cortes, D. Auclair, M. F. Berger, G. Saksena, C. Guiducci, R. C. Onofrio, M. Parkin, M. Romkes, J. L. Weissfeld, R. R. Seethala, L. Wang, C. Rangel-Escareno, J. C. Fernandez-Lopez, A. Hidalgo-Miranda, J. Melendez-Zajgla, W. Winckler, K. Ardlie, S. B. Gabriel, M. Meyerson, E. S. Lander, G. Getz, T. R. Golub, L. A. Garraway and J. R. Grandis (2011). "The mutational landscape of head and neck squamous cell carcinoma." *Science* **333**(6046): 1157-1160.
- Strosberg, J. R., T. Yeatman, J. Weber, D. Coppola, M. J. Schell, G. Han, K. Almhanna, R. Kim, T. Valone, H. Jump and D. Sullivan (2012). "A phase II study of RO4929097 in metastatic colorectal cancer." *Eur J Cancer* **48**(7): 997-1003.

- Struhl, G. and I. Greenwald (1999). "Presenilin is required for activity and nuclear access of Notch in *Drosophila*." Nature **398**(6727): 522-525.
- Studebaker, A. W., G. Storci, J. L. Werbeck, P. Sansone, A. K. Sasser, S. Tavolari, T. Huang, M. W. Chan, F. C. Marini, T. J. Rosol, M. Bonafe and B. M. Hall (2008). "Fibroblasts isolated from common sites of breast cancer metastasis enhance cancer cell growth rates and invasiveness in an interleukin-6-dependent manner." Cancer Res **68**(21): 9087-9095.
- Suchting, S., C. Freitas, F. le Noble, R. Benedito, C. Breant, A. Duarte and A. Eichmann (2007). "The Notch ligand Delta-like 4 negatively regulates endothelial tip cell formation and vessel branching." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(9): 3225-3230.
- Sun, D., H. Li and A. Zolkiewska (2008). "The role of Delta-like 1 shedding in muscle cell self-renewal and differentiation." J Cell Sci **121**(Pt 22): 3815-3823.
- Sun, X. and S. Artavanis-Tsakonas (1997). "Secreted forms of DELTA and SERRATE define antagonists of Notch signaling in *Drosophila*." Development **124**(17): 3439-3448.
- Tagami, S., M. Okochi, K. Yanagida, A. Ikuta, A. Fukumori, N. Matsumoto, Y. Ishizuka-Katsura, T. Nakayama, N. Itoh, J. Jiang, K. Nishitomi, K. Kamino, T. Morihara, R. Hashimoto, T. Tanaka, T. Kudo, S. Chiba and M. Takeda (2008). "Regulation of Notch signaling by dynamic changes in the precision of S3 cleavage of Notch-1." Mol Cell Biol **28**(1): 165-176.
- Taghon, T. (2009). "Regulation of early T cell development in mouse and human by Notch." Verh K Acad Geneesk Belg **71**(5): 301-314.
- Taghon, T. and E. V. Rothenberg (2008). "Molecular mechanisms that control mouse and human TCR-alpha-beta and TCR-gammadelta T cell development." Semin Immunopathol **30**(4): 383-398.
- Taghon, T., M. A. Yui, R. Pant, R. A. Diamond and E. V. Rothenberg (2006). "Developmental and molecular characterization of emerging beta- and gammadelta-selected pre-T cells in the adult mouse thymus." Immunity **24**(1): 53-64.
- Taipale, M., I. Krykbaeva, M. Koeva, C. Kayatekin, K. D. Westover, G. I. Karras and S. Lindquist (2012). "Quantitative analysis of HSP90-client interactions reveals principles of substrate recognition." Cell **150**(5): 987-1001.
- Takahashi, Y., T. Inoue, A. Gossler and Y. Saga (2003). "Feedback loops comprising Dll1, Dll3 and Mesp2, and differential involvement of Psen1 are essential for rostrocaudal patterning of somites." Development **130**(18): 4259-4268.
- Takeuchi, H. and R. S. Haltiwanger (2014). "Significance of glycosylation in Notch signaling." Biochem Biophys Res Commun **453**(2): 235-242.
- Talora, C., A. F. Campese, D. Bellavia, M. P. Felli, A. Vacca, A. Gulino and I. Screpanti (2008). "Notch signaling and diseases: an evolutionary journey from a simple beginning to complex outcomes." Biochim Biophys Acta **1782**(9): 489-497.
- Tan, J. B., I. Visan, J. S. Yuan and C. J. Guidos (2005). "Requirement for Notch1 signals at sequential early stages of intrathymic T cell development." Nat Immunol **6**(7): 671-679.
- Tanigaki, K., M. Tsuji, N. Yamamoto, H. Han, J. Tsukada, H. Inoue, M. Kubo and T. Honjo (2004). "Regulation of alpha-beta/gammadelta T cell lineage commitment and peripheral T cell responses by Notch/RBP-J signaling." Immunity **20**(5): 611-622.

- Tarassishin, L., Y. I. Yin, B. Bassit and Y. M. Li (2004). "Processing of Notch and amyloid precursor protein by gamma-secretase is spatially distinct." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(49): 17050-17055.
- Tatarek, J., K. Cullion, T. Ashworth, R. Gerstein, J. C. Aster and M. A. Kelliher (2011). "Notch1 inhibition targets the leukemia-initiating cells in a Tal1/Lmo2 mouse model of T-ALL." Blood **118**(6): 1579-1590.
- Tax, F. E., J. J. Yeagers and J. H. Thomas (1994). "Sequence of *C. elegans* lag-2 reveals a cell-signalling domain shared with Delta and Serrate of *Drosophila*." Nature **368**(6467): 150-154.
- Taylor, P., H. Takeuchi, D. Sheppard, C. Chillakuri, S. M. Lea, R. S. Haltiwanger and P. A. Handford (2014). "Fringe-mediated extension of O-linked fucose in the ligand-binding region of Notch1 increases binding to mammalian Notch ligands." Proc Natl Acad Sci U S A **111**(20): 7290-7295.
- Theodoraki, M. A., M. Kunjappu, D. W. Sternberg and A. J. Caplan (2007). "Akt shows variable sensitivity to an Hsp90 inhibitor depending on cell context." Exp Cell Res **313**(18): 3851-3858.
- Thibout, H., C. Martinerie, C. Creminon, F. Godeau, P. Boudou, Y. Le Bouc and M. Laurent (2003). "Characterization of human NOV in biological fluids: an enzyme immunoassay for the quantification of human NOV in sera from patients with diseases of the adrenal gland and of the nervous system." J Clin Endocrinol Metab **88**(1): 327-336.
- Thompson, B. J., S. Buonamici, M. L. Sulis, T. Palomero, T. Vilimas, G. Basso, A. Ferrando and I. Aifantis (2007). "The SCFFBW7 ubiquitin ligase complex as a tumor suppressor in T cell leukemia." J Exp Med **204**(8): 1825-1835.
- Thompson, P. K. and J. C. Zuniga-Pflucker (2011). "On becoming a T cell, a convergence of factors kick it up a Notch along the way." Semin Immunol **23**(5): 350-359.
- Tian, L., X. Wu, C. Chi, M. Han, T. Xu and Y. Zhuang (2008). "ADAM10 is essential for proteolytic activation of Notch during thymocyte development." Int Immunol **20**(9): 1181-1187.
- Tolcher, A.W., R. Chugh, et al. (2012). "A first-in-human phase I study to evaluate the fully human monoclonal antibody OMP-59R5 (anti-Notch2/3) administered intravenously to patients with advanced solid tumors". J. Clin. Oncol. Abstr. **30**, 3025.
- Tolcher, A. W., W. A. Messersmith, S. M. Mikulski, K. P. Papadopoulos, E. L. Kwak, D. G. Gibbon, A. Patnaik, G. S. Falchook, A. Dasari, G. I. Shapiro, J. F. Boylan, Z. X. Xu, K. Wang, A. Koehler, J. Song, S. A. Middleton, J. Deutsch, M. Demario, R. Kurzrock and J. J. Wheler (2012). "Phase I study of RO4929097, a gamma secretase inhibitor of Notch signaling, in patients with refractory metastatic or locally advanced solid tumors." J Clin Oncol **30**(19): 2348-2353.
- Tousseyn, T., A. Thathiah, E. Jorissen, T. Raemaekers, U. Konietzko, K. Reiss, E. Maes, A. Snellinx, L. Serneels, O. Nyabi, W. Annaert, P. Saftig, D. Hartmann and B. De Strooper (2009). "ADAM10, the rate-limiting protease of regulated intramembrane proteolysis of Notch and other proteins, is processed by ADAMS-9, ADAMS-15, and the gamma-secretase." J Biol Chem **284**(17): 11738-11747.
- Tremblay, M., C. S. Tremblay, S. Herblot, P. D. Aplan, J. Hebert, C. Perreault and T. Hoang (2010). "Modeling T-cell acute lymphoblastic leukemia induced by the SCL and LMO1 oncogenes." Genes Dev **24**(11): 1093-1105.

- Tschaharganeh, D. F., X. Chen, P. Latzko, M. Malz, M. M. Gaida, K. Felix, S. Ladu, S. Singer, F. Pinna, N. Gretz, C. Sticht, M. L. Tomasi, S. Delogu, M. Evert, B. Fan, S. Ribback, L. Jiang, S. Brozzetti, F. Bergmann, F. Dombrowski, P. Schirmacher, D. F. Calvisi and K. Breuhahn (2013). "Yes-associated protein up-regulates Jagged-1 and activates the Notch pathway in human hepatocellular carcinoma." Gastroenterology **144**(7): 1530-1542 e1512.
- Tse, W. K., B. Eisenhaber, S. H. Ho, Q. Ng, F. Eisenhaber and Y. J. Jiang (2009). "Genome-wide loss-of-function analysis of deubiquitylating enzymes for zebrafish development." BMC Genomics **10**: 637.
- Tsiftoglou, A. S., I. D. Bonovolias and S. A. Tsiftoglou (2009). "Multilevel targeting of hematopoietic stem cell self-renewal, differentiation and apoptosis for leukemia therapy." Pharmacol Ther **122**(3): 264-280.
- Tsivitse, S. (2010). "Notch and Wnt signaling, physiological stimuli and postnatal myogenesis." Int J Biol Sci **6**(3): 268-281.
- Tsunematsu, R., K. Nakayama, Y. Oike, M. Nishiyama, N. Ishida, S. Hatakeyama, Y. Bessho, R. Kageyama, T. Suda and K. I. Nakayama (2004). "Mouse Fbw7/Sel-10/Cdc4 is required for notch degradation during vascular development." J Biol Chem **279**(10): 9417-9423.
- Tung, J. J., I. W. Tattersall and J. Kitajewski (2012). "Tips, stalks, tubes: notch-mediated cell fate determination and mechanisms of tubulogenesis during angiogenesis." Cold Spring Harb Perspect Med **2**(2): a006601.
- Turnpenny, P. D., N. Whittock, J. Duncan, S. Dunwoodie, K. Kusumi and S. Ellard (2003). "Novel mutations in DLL3, a somitogenesis gene encoding a ligand for the Notch signalling pathway, cause a consistent pattern of abnormal vertebral segmentation in spondylocostal dysostosis." J Med Genet **40**(5): 333-339.
- Uemura, T., S. Shepherd, L. Ackerman, L. Y. Jan and Y. N. Jan (1989). "numb, a gene required in determination of cell fate during sensory organ formation in *Drosophila* embryos." Cell **58**(2): 349-360.
- Upadhyay, A., V. Kandachar, D. Zitserman, X. Tong and F. Roegiers (2013). "Sanpodo controls sensory organ precursor fate by directing Notch trafficking and binding gamma-secretase." J Cell Biol **201**(3): 439-448.
- Vaccari, T., S. Duchi, K. Cortese, C. Tacchetti and D. Bilder (2010). "The vacuolar ATPase is required for physiological as well as pathological activation of the Notch receptor." Development **137**(11): 1825-1832.
- Vaccari, T., H. Lu, R. Kanwar, M. E. Fortini and D. Bilder (2008). "Endosomal entry regulates Notch receptor activation in *Drosophila melanogaster*." J Cell Biol **180**(4): 755-762.
- Valapala, M., S. Hose, C. Gongora, L. Dong, E. F. Wawrousek, J. Samuel Zigler, Jr. and D. Sinha (2013). "Impaired endolysosomal function disrupts Notch signalling in optic nerve astrocytes." Nat Commun **4**: 1629.
- Van de Walle, I., G. De Smet, M. De Smedt, B. Vandekerckhove, G. Leclercq, J. Plum and T. Taghon (2009). "An early decrease in Notch activation is required for human TCR-alpha-beta lineage differentiation at the expense of TCR-gammadelta T cells." Blood **113**(13): 2988-2998.

- van Tetering, G., P. van Diest, I. Verlaan, E. van der Wall, R. Kopan and M. Vooijs (2009). "Metalloprotease ADAM10 is required for Notch1 site 2 cleavage." J Biol Chem **284**(45): 31018-31027.
- Varnum-Finney, B., L. Wu, M. Yu, C. Brashem-Stein, S. Staats, D. Flowers, J. D. Griffin and I. D. Bernstein (2000). "Immobilization of Notch ligand, Delta-1, is required for induction of notch signaling." J Cell Sci **113 Pt 23**: 4313-4318.
- Vas, V., L. Szilagy, K. Paloczi and F. Uher (2004). "Soluble Jagged-1 is able to inhibit the function of its multivalent form to induce hematopoietic stem cell self-renewal in a surrogate in vitro assay." J Leukoc Biol **75**(4): 714-720.
- Veeraraghavalu, K., M. Pett, R. V. Kumar, P. Nair, A. Rangarajan, M. A. Stanley and S. Krishna (2004). "Papillomavirus-mediated neoplastic progression is associated with reciprocal changes in JAGGED1 and manic fringe expression linked to notch activation." J Virol **78**(16): 8687-8700.
- Viatour, P., U. Ehmer, L. A. Saddic, C. Dorrell, J. B. Andersen, C. Lin, A. F. Zmoos, P. K. Mazur, B. E. Schaffer, A. Ostermeier, H. Vogel, K. G. Sylvester, S. S. Thorgeirsson, M. Grompe and J. Sage (2011). "Notch signaling inhibits hepatocellular carcinoma following inactivation of the RB pathway." J Exp Med **208**(10): 1963-1976.
- Visan, I., J. B. Tan, J. S. Yuan, J. A. Harper, U. Koch and C. J. Gidos (2006). "Regulation of T lymphopoiesis by Notch1 and Lunatic fringe-mediated competition for intrathymic niches." Nat Immunol **7**(6): 634-643.
- Vitt, U. A., S. Y. Hsu and A. J. Hsueh (2001). "Evolution and classification of cystine knot-containing hormones and related extracellular signaling molecules." Mol Endocrinol **15**(5): 681-694.
- Wallberg, A. E., K. Pedersen, U. Lendahl and R. G. Roeder (2002). "p300 and PCAF act cooperatively to mediate transcriptional activation from chromatin templates by notch intracellular domains in vitro." Mol Cell Biol **22**(22): 7812-7819.
- Walton-Diaz, A., S. Khan, D. Bourboulia, J. B. Trepel, L. Neckers and M. Mollapour (2013). "Contributions of co-chaperones and post-translational modifications towards Hsp90 drug sensitivity." Future Med Chem **5**(9): 1059-1071.
- Wang, W. and G. Struhl (2004). "Drosophila Epsin mediates a select endocytic pathway that DSL ligands must enter to activate Notch." Development **131**(21): 5367-5380.
- Wang, W. and G. Struhl (2005). "Distinct roles for Mind bomb, Neuralized and Epsin in mediating DSL endocytosis and signaling in Drosophila." Development **132**(12): 2883-2894.
- Wang, X. D., C. C. Leow, J. Zha, Z. Tang, Z. Modrusan, F. Radtke, M. Aguet, F. J. de Sauvage and W. Q. Gao (2006). "Notch signaling is required for normal prostatic epithelial cell proliferation and differentiation." Dev Biol **290**(1): 66-80.
- Wang, X. D., J. Shou, P. Wong, D. M. French and W. Q. Gao (2004). "Notch1-expressing cells are indispensable for prostatic branching morphogenesis during development and re-growth following castration and androgen replacement." J Biol Chem **279**(23): 24733-24744.
- Wang, Y., K. A. Kim, J. H. Kim and H. S. Sul (2006). "Pref-1, a preadipocyte secreted factor that inhibits adipogenesis." J Nutr **136**(12): 2953-2956.
- Wang, Z., Y. Li, A. Ahmad, A. S. Azmi, S. Banerjee, D. Kong and F. H. Sarkar (2010). "Targeting Notch signaling pathway to overcome drug resistance for cancer therapy." Biochim Biophys Acta **1806**(2): 258-267.

- Warthen, D. M., E. C. Moore, B. M. Kamath, J. J. Morrisette, P. A. Sanchez-Lara, D. A. Piccoli, I. D. Krantz and N. B. Spinner (2006). "Jagged1 (JAG1) mutations in Alagille syndrome: increasing the mutation detection rate." *Hum Mutat* **27**(5): 436-443.
- Watt, F. M., S. Estrach and C. A. Ambler (2008). "Epidermal Notch signalling: differentiation, cancer and adhesion." *Curr Opin Cell Biol* **20**(2): 171-179.
- Weinmaster, G. (1997). "The ins and outs of notch signaling." *Mol Cell Neurosci* **9**(2): 91-102.
- Weinmaster, G. and J. A. Fischer (2011). "Notch ligand ubiquitylation: what is it good for?" *Dev Cell* **21**(1): 134-144.
- Weng, A. P. and J. C. Aster (2004). "Multiple niches for Notch in cancer: context is everything." *Curr Opin Genet Dev* **14**(1): 48-54.
- Weng, A. P., A. A. Ferrando, W. Lee, J. P. t. Morris, L. B. Silverman, C. Sanchez-Irizarry, S. C. Blacklow, A. T. Look and J. C. Aster (2004). "Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia." *Science* **306**(5694): 269-271.
- Weng, A. P., J. M. Millholland, Y. Yashiro-Ohtani, M. L. Arcangeli, A. Lau, C. Wai, C. Del Bianco, C. G. Rodriguez, H. Sai, J. Tobias, Y. Li, M. S. Wolfe, C. Shachaf, D. Felsher, S. C. Blacklow, W. S. Pear and J. C. Aster (2006). "c-Myc is an important direct target of Notch1 in T-cell acute lymphoblastic leukemia/lymphoma." *Genes Dev* **20**(15): 2096-2109.
- Weng, A. P., Y. Nam, M. S. Wolfe, W. S. Pear, J. D. Griffin, S. C. Blacklow and J. C. Aster (2003). "Growth suppression of pre-T acute lymphoblastic leukemia cells by inhibition of notch signaling." *Mol Cell Biol* **23**(2): 655-664.
- Wesley, C. S. (1999). "Notch and wingless regulate expression of cuticle patterning genes." *Mol Cell Biol* **19**(8): 5743-5758.
- Westhoff, B., I. N. Colaluca, G. D'Ario, M. Donzelli, D. Tosoni, S. Volorio, G. Pelosi, L. Spaggiari, G. Mazzarol, G. Viale, S. Pece and P. P. Di Fiore (2009). "Alterations of the Notch pathway in lung cancer." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(52): 22293-22298.
- Wharton, K. A., K. M. Johansen, T. Xu and S. Artavanis-Tsakonas (1985). "Nucleotide sequence from the neurogenic locus notch implies a gene product that shares homology with proteins containing EGF-like repeats." *Cell* **43**(3 Pt 2): 567-581.
- Wilkin, M., P. Tongngok, N. Gensch, S. Clemence, M. Motoki, K. Yamada, K. Hori, M. Taniguchi-Kanai, E. Franklin, K. Matsuno and M. Baron (2008). "Drosophila HOPS and AP-3 complex genes are required for a Deltex-regulated activation of notch in the endosomal trafficking pathway." *Dev Cell* **15**(5): 762-772.
- Wilkin, M. B., A. M. Carbery, M. Fostier, H. Aslam, S. L. Mazaleyrat, J. Higgs, A. Myat, D. A. Evans, M. Cornell and M. Baron (2004). "Regulation of notch endosomal sorting and signaling by Drosophila Nedd4 family proteins." *Curr Biol* **14**(24): 2237-2244.
- Wilson, A., H. R. MacDonald and F. Radtke (2001). "Notch 1-deficient common lymphoid precursors adopt a B cell fate in the thymus." *J Exp Med* **194**(7): 1003-1012.
- Wilson, J. J. and R. A. Kovall (2006). "Crystal structure of the CSL-Notch-Mastermind ternary complex bound to DNA." *Cell* **124**(5): 985-996.
- Windler, S. L. and D. Bilder (2010). "Endocytic internalization routes required for delta/notch signaling." *Curr Biol* **20**(6): 538-543.
- Wolfe, M. S. (2012). "gamma-Secretase as a target for Alzheimer's disease." *Adv Pharmacol* **64**: 127-153.

- Wolfer, A., A. Wilson, M. Nemir, H. R. MacDonald and F. Radtke (2002). "Inactivation of Notch1 impairs VDJbeta rearrangement and allows pre-TCR-independent survival of early alpha beta Lineage Thymocytes." *Immunity* **16**(6): 869-879.
- Wright, G. J., J. D. Leslie, L. Ariza-McNaughton and J. Lewis (2004). "Delta proteins and MAGI proteins: an interaction of Notch ligands with intracellular scaffolding molecules and its significance for zebrafish development." *Development* **131**(22): 5659-5669.
- Wu, Y., C. Cain-Hom, L. Choy, T. J. Hagenbeek, G. P. de Leon, Y. Chen, D. Finkle, R. Venook, X. Wu, J. Ridgway, D. Schahin-Reed, G. J. Dow, A. Shelton, S. Stawicki, R. J. Watts, J. Zhang, R. Choy, P. Howard, L. Kadyk, M. Yan, J. Zha, C. A. Callahan, S. G. Hymowitz and C. W. Siebel (2010). "Therapeutic antibody targeting of individual Notch receptors." *Nature* **464**(7291): 1052-1057.
- Xu, K., N. Moghal and S. E. Egan (2012). "Notch signaling in lung development and disease." *Adv Exp Med Biol* **727**: 89-98.
- Xu, W. and L. Neckers (2012). "The double edge of the HSP90-CDC37 chaperone machinery: opposing determinants of kinase stability and activity." *Future Oncol* **8**(8): 939-942.
- Yamada, K., T. J. Fuwa, T. Ayukawa, T. Tanaka, A. Nakamura, M. B. Wilkin, M. Baron and K. Matsuno (2011). "Roles of *Drosophila* deltex in Notch receptor endocytic trafficking and activation." *Genes Cells* **16**(3): 261-272.
- Yao, L., Q. Cao, C. Wu, C. Kaur, A. Hao and E. A. Ling (2013). "Notch signaling in the central nervous system with special reference to its expression in microglia." *CNS Neurol Disord Drug Targets* **12**(6): 807-814.
- Yashiro-Ohtani, Y., Y. He, T. Ohtani, M. E. Jones, O. Shestova, L. Xu, T. C. Fang, M. Y. Chiang, A. M. Intlekofer, S. C. Blacklow, Y. Zhuang and W. S. Pear (2009). "Pre-TCR signaling inactivates Notch1 transcription by antagonizing E2A." *Genes Dev* **23**(14): 1665-1676.
- Yashiro-Ohtani, Y., T. Ohtani and W. S. Pear (2010). "Notch regulation of early thymocyte development." *Semin Immunol* **22**(5): 261-269.
- Yeh, E., M. Dermer, C. Commisso, L. Zhou, C. J. McGlade and G. L. Boulianne (2001). "Neutralized functions as an E3 ubiquitin ligase during *Drosophila* development." *Curr Biol* **11**(21): 1675-1679.
- Yin, C., J. Ye, J. Zou, T. Lu, Y. Du, Z. Liu, R. Fan, F. Lu, P. Li, D. Ma and C. Ji (2015). "Role of stromal cells-mediated Notch-1 in the invasion of T-ALL cells." *Exp Cell Res*.
- Yin, X., T. Chtanova, E. Ladi and E. A. Robey (2006). "Thymocyte motility: mutants, movies and migration patterns." *Curr Opin Immunol* **18**(2): 191-197.
- Yu, S. D., F. Y. Liu and Q. R. Wang (2012). "Notch inhibitor: a promising carcinoma radiosensitizer." *Asian Pac J Cancer Prev* **13**(11): 5345-5351.
- Yuan, J. S., P. C. Kousis, S. Suliman, I. Visan and C. J. Guidos (2010). "Functions of notch signaling in the immune system: consensus and controversies." *Annu Rev Immunol* **28**: 343-365.
- Zhang, C., Q. Li, C. H. Lim, X. Qiu and Y. J. Jiang (2007). "The characterization of zebrafish antimorphic mib alleles reveals that Mib and Mind bomb-2 (Mib2) function redundantly." *Dev Biol* **305**(1): 14-27.
- Zhang, J., M. Liu, Y. Su, J. Du and A. J. Zhu (2012). "A targeted in vivo RNAi screen reveals deubiquitinases as new regulators of Notch signaling." *G3 (Bethesda)* **2**(12): 1563-1575.

- Zhang, L., R. C. Widau, B. P. Herring and P. J. Gallagher (2011). "Delta-like 1-Lysine613 regulates notch signaling." Biochim Biophys Acta **1813**(12): 2036-2043.
- Zhao, C., H. Guo, J. Li, T. Myint, W. Pittman, L. Yang, W. Zhong, R. J. Schwartz, J. J. Schwarz, H. A. Singer, M. D. Tallquist and M. Wu (2014). "Numb family proteins are essential for cardiac morphogenesis and progenitor differentiation." Development **141**(2): 281-295.
- Zhao, G., Z. Liu, M. X. Ilagan and R. Kopan (2010). "Gamma-secretase composed of PS1/Pen2/Aph1a can cleave notch and amyloid precursor protein in the absence of nicastrin." J Neurosci **30**(5): 1648-1656.
- Zheng, X., S. Linke, J. M. Dias, X. Zheng, K. Gradin, T. P. Wallis, B. R. Hamilton, M. Gustafsson, J. L. Ruas, S. Wilkins, R. L. Bilton, K. Brismar, M. L. Whitelaw, T. Pereira, J. J. Gorman, J. Ericson, D. J. Peet, U. Lendahl and L. Poellinger (2008). "Interaction with factor inhibiting HIF-1 defines an additional mode of cross-coupling between the Notch and hypoxia signaling pathways." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(9): 3368-3373.
- Zhong, W., M. M. Jiang, G. Weinmaster, L. Y. Jan and Y. N. Jan (1997). "Differential expression of mammalian Numb, Numlike and Notch1 suggests distinct roles during mouse cortical neurogenesis." Development **124**(10): 1887-1897.
- Zhou, S., M. Fujimuro, J. J. Hsieh, L. Chen, A. Miyamoto, G. Weinmaster and S. D. Hayward (2000). "SKIP, a CBF1-associated protein, interacts with the ankyrin repeat domain of NotchIC To facilitate NotchIC function." Mol Cell Biol **20**(7): 2400-2410.
- Zhou, S. and S. D. Hayward (2001). "Nuclear localization of CBF1 is regulated by interactions with the SMRT corepressor complex." Mol Cell Biol **21**(18): 6222-6232.
- Zhou, S., H. Zhou, P. J. Walian and B. K. Jap (2006). "The discovery and role of CD147 as a subunit of gamma-secretase complex." Drug News Perspect **19**(3): 133-138.
- 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.
- Zhu, H., X. Zhou, S. Redfield, J. Lewin and L. Miele (2013). "Elevated Jagged-1 and Notch-1 expression in high grade and metastatic prostate cancers." Am J Transl Res **5**(3): 368-378.
- Zolkiewska, A. (2008). "ADAM proteases: ligand processing and modulation of the Notch pathway." Cell Mol Life Sci **65**(13): 2056-2068.
- Zong, Y. and B. Z. Stanger (2011). "Molecular mechanisms of bile duct development." Int J Biochem Cell Biol **43**(2): 257-264.
- Zuniga-Pflucker, J. C. (2004). "T-cell development made simple." Nat Rev Immunol **4**(1): 67-72.
- Zweidler-McKay, P. A., Y. He, L. Xu, C. G. Rodriguez, F. G. Karnell, A. C. Carpenter, J. C. Aster, D. Allman and W. S. Pear (2005). "Notch signaling is a potent inducer of growth arrest and apoptosis in a wide range of B-cell malignancies." Blood **106**(12): 3898-3906.

