

## Bases moléculaires et mécanismes physiopathogéniques de CADASIL : un modèle de maladie des petites artères cérébrales

par A. Joutel<sup>1,2</sup> & E. Tournier-Lasserre<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>EMI 99-21, Faculté de Médecine Lariboisière, 10, avenue de Verdun, 75010 Paris ; <sup>2</sup>Laboratoire de Cytogénétique, Hôpital Lariboisière, 2, rue Ambroise Paré, Paris. Tél. : 01 44 89 77 50. Fax : 01 44 89 77 55.  
E-mail : joutel@paris7.jussieu.fr

Reçu le 19 décembre 2001

### RÉSUMÉ

Les maladies des petites artères cérébrales sont la cause d'environ 20 % des accidents ischémiques cérébraux. Leur diagnostic est difficile et leurs mécanismes physiopathogéniques très obscurs. Un certain nombre de ces artériopathies sont familiales. A la fin des années 80, une forme autosomique dominante d'artériopathie cérébrale, CADASIL, se manifestant par des accidents ischémiques cérébraux récurrents, des troubles cognitifs et une atteinte sévère de la substance blanche a été identifiée dans un très petit nombre de familles. Nous avons établi qu'un gène de la famille très conservée des récepteurs Notch impliqués dans les processus de différenciation et de prolifération cellulaire au cours du développement, *Notch3*, était le gène responsable de CADASIL. À ce jour, plus de 300 familles ont été étudiées et, récemment, des cas sporadiques liés à une néomutation ont été identifiés, suggérant que CADASIL n'est probablement pas une cause rare d'artériopathie cérébrale. On ne connaît pas encore le rôle exact de Notch3. Nous avons récemment montré que, chez l'homme

adulte, l'expression de Notch3 est restreinte aux vaisseaux et à la cellule musculaire lisse. Par ailleurs, nous avons établi que, chez les patients CADASIL, il existe une anomalie de la clairance de Notch3 entraînant son accumulation à la membrane cytoplasmique des cellules musculaires lisses vasculaires. Les résultats de ces travaux indiquent donc que la cellule musculaire lisse vasculaire est la cible primaire du processus pathogène de CADASIL. Par ailleurs ils suggèrent fortement que la voie de signalisation Notch3 est impliquée dans l'homéostasie du vaisseau adulte. Enfin ces travaux ouvrent de nouvelles perspectives dans le domaine de la pathologie neurovasculaire. En particulier la mise au point d'un test diagnostique de CADASIL fiable et faisable en routine permettra prochainement de déterminer la prévalence de cette affection, 1<sup>ère</sup> étape dans le démantèlement des maladies des petites artères cérébrales, affections pour lesquelles les partenaires de Notch3 sont autant de candidats potentiels.

### SUMMARY Molecular genetic and pathogenic mechanisms of CADASIL: a model of small-vessel diseases of the brain

Diseases of the small cerebral arteries account for ~ 20 % of the ischaemic strokes. Their diagnosis is difficult and their pathogenic mechanisms are yet unclear. A certain proportion of these diseases is familial. CADASIL is a recently identified small-artery disease of the brain, which occurs both as an autosomal dominant and a sporadic condition caused by mutations in the *Notch3* gene. Since the acronym CADASIL was coined to designate this disorder in 1993, an exponentially growing number of patients has been identified all over the world. *Notch3* belongs to the highly conserved *Notch* genes family which encode transmembrane receptors involved in cell fate specification during development. The role of Notch3 is so far unknown. We recently established that in

normal adult tissues expression of Notch3 is essentially restricted to vessel and vascular smooth muscle cells (VSMC). CADASIL patients carry highly stereotyped mutations leading to an odd number of cysteine residues within the extracellular domain. Mutations are associated with an impaired clearance of the Notch3 protein leading to its abnormal accumulation at the membrane of VSMC. These data establish that VSMC is the primary target of the pathogenic process. In addition they give support to the role of the Notch3 pathway in vascular homeostasis. Furthermore, they open new perspectives in the field of small-artery diseases of the brain and should help to further dissect their genetic etiologies and understand their pathogenic mechanisms.

Les accidents vasculaires cérébraux (AVC) constituent la 3<sup>ème</sup> cause de décès et la 1<sup>ère</sup> cause de handicap dans les pays industrialisés; leur récurrence conduit à une démence appelée vasculaire, 2<sup>ème</sup> cause de démence après la maladie d'Alzheimer. Les AVC sont de nature ischémique dans 80 % des cas. Chez 40 % des patients, l'accident ischémique cérébral (AIC) résulte de l'occlusion d'une artère cérébrale par un thrombus initialement formé au niveau des artères à destination cérébrale (carotide, crosse de l'aorte), des valves ou des cavités cardiaques (AIC thromboemboliques). Chez environ 20 % des patients l'AIC est imputé à une maladie des petites artères cérébrales, c'est-à-dire à une maladie des artérioles du parenchyme cérébral de diamètre inférieur à 400  $\mu\text{m}$ . Enfin chez un nombre très élevé de patients (40 %), la cause de l'AIC reste indéterminée ou inconnue malgré un bilan approfondi (Elbaz *et al.*, 2000). Bien que fréquentes, les maladies des petites artères cérébrales représentent le parent pauvre de la pathologie neurovasculaire à plusieurs titres. Du vivant du patient le diagnostic de maladie des petites artères cérébrales ne peut être établi avec certitude mais seulement suspecté sur la symptomatologie clinique de l'AIC (syndrome lacunaire) et la taille de l'infarctus (< 15 mm à l'examen par résonance magnétique de l'encéphale). Les mécanismes physiopathogéniques des maladies des petites artères cérébrales sont encore très mal connus. Par opposition avec les artères à destination cérébrale dont les mécanismes lésionnels sont assez bien connus et dominés par l'athérome, les causes des lésions des artérioles intracérébrales sont plus obscures. Ces dernières ne sont habituellement pas le siège de lésions athéromateuses, et la responsabilité de l'hypertension artérielle ou du diabète fréquemment incriminés n'a jamais été clairement démontrée. En outre les AIC en rapport avec une maladie des petites artères cérébrales ne résulteraient pas nécessairement d'une occlusion vasculaire. Enfin, les possibilités thérapeutiques tant préventives que curatives sont quasi inexistantes.

À la fin des années 80 l'étude d'une très grande famille a permis l'individualisation d'une nouvelle entité, CADASIL (Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy) comme une cause bien définie de maladie des petites artères cérébrales (Tournier-Lasserre *et al.*, 1991; Tournier-Lasserre *et al.*, 1993; Baudrimont *et al.*, 1993). Il s'agit d'une maladie héréditaire avec un mode de transmission autosomique dominant. La symptomatologie clinique comporte des accidents ischémiques cérébraux récidivants, ainsi que des accès de migraine avec aura, des troubles de l'humeur et des troubles cognitifs. Les premiers symptômes apparaissent vers l'âge de 45 ans. Cependant il est à noter qu'il existe une très grande variabilité de l'âge de début et de la nature des premiers symptômes d'un patient à l'autre au sein d'une même famille et d'une famille à l'autre. Néanmoins, l'évolution est assez constante et comporte une démence de type sous-cortical, un état grabataire et le décès prématuré du patient vers l'âge de 65 ans (Chabriat *et al.*, 1995; Dichgans *et al.*, 1998). Les lésions du parenchyme cérébral

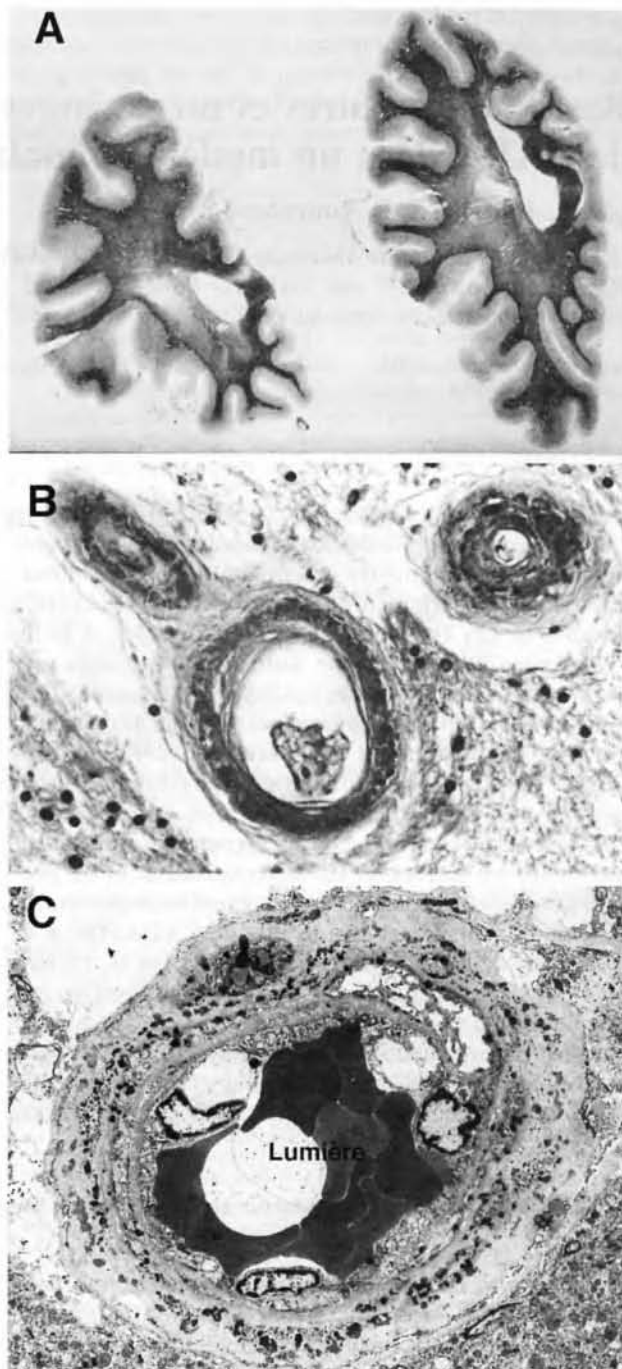


FIG. 1. – Lésions histologiques caractéristiques de CADASIL.

A. Sections coronales d'un hémisphère cérébral après coloration par le Luxol-Bodian montrant une pâleur diffuse de la myéline et de multiples infarctus (cliché aimablement confié par M. M. Ruchoux).

B. Section d'artérioles cérébrales, examinée en microscopie optique après coloration par hématoxyline éosine, montrant un épaississement anormal de la média des vaisseaux et une quasi-disparition des cellules musculaires lisses (cliché aimablement confié par M. Arnaboldi).

C. Section d'une artériole cérébelleuse, examinée en microscopie électronique, montrant d'innombrables dépôts granulaires osmophiles au niveau de la paroi. Notez la difficulté à reconnaître des cellules musculaires lisses (cliché aimablement confié par M. M. Ruchoux).

comportent outre des infarctus multiples de petite taille siégeant dans les noyaux gris et la substance blanche, une atteinte diffuse et symétrique de la substance blanche hémisphérique à type de démyélinisation (Fig. 1A). Ces lésions se traduisent en imagerie par résonance magnétique de l'encéphale par des hyposignaux focaux des noyaux gris et de la substance blanche en séquence pondérée T1 et des hypersignaux plus diffus et relativement symétriques de la substance blanche en séquence pondérée T2 (Chabriat *et al.*, 1998). CADASIL est sous-tendue par une artériopathie non-amyloïde et non-artérioscléreuse qui affecte principalement les petites artères perforantes de la substance blanche cérébrale profonde et des noyaux gris centraux. Les lésions vasculaires sont caractérisées par *i*) des altérations morphologiques très sévères des cellules musculaires lisses vasculaires conduisant à leur disparition progressive et *ii*) la présence dans la paroi artérielle d'un matériel de nature encore inconnue qui est formé en microscopie électronique de dépôts granulaires osmiophiles (GOM) enchâssés dans la membrane basale des cellules musculaires lisses vasculaires; ces dépôts osmiophiles, qui n'ont jamais été observés dans aucune autre pathologie artérielle, sont pathognomoniques de CADASIL (Fig. 1 B-C)

(Baudrimont *et al.*, 1993; Ruchoux *et al.*, 1997). De façon extrêmement intéressante, des altérations identiques des cellules musculaires lisses vasculaires ont été mises en évidence au niveau des petites artères des autres organes suggérant que CADASIL est une angiopathie systémique mais avec une expression clinique limitée au système nerveux central (Ruchoux *et al.*, 1995).

Par une approche de type clonage positionnel, nous avons localisé le gène morbide de CADASIL sur le bras court du chromosome 19, identifié le gène *Notch3* puis établi que les mutations de ce gène sont responsables de CADASIL (Tournier-Lasserre *et al.*, 1993; Joutel *et al.*, 1996). *Notch3* appartient à la famille très conservée des gènes *Notch*. Celle-ci comporte un membre fondateur cloné chez *Drosophila melanogaster* (*Notch*) et 4 gènes très homologues identifiés par la suite chez les mammifères (*Notch1-4*). Les gènes *Notch* codent pour des récepteurs à un seul domaine transmembranaire présentant une forte homologie de séquence entre eux et caractérisés par la présence de 29 à 36 répétitions du motif Epidermal Growth Factor (EGF) au niveau de leur domaine extracellulaire et de 6 répétitions Cdc10-ankyrine flanquées de part et d'autre d'un signal de localisation nucléaire au niveau de leur domaine cytosolique

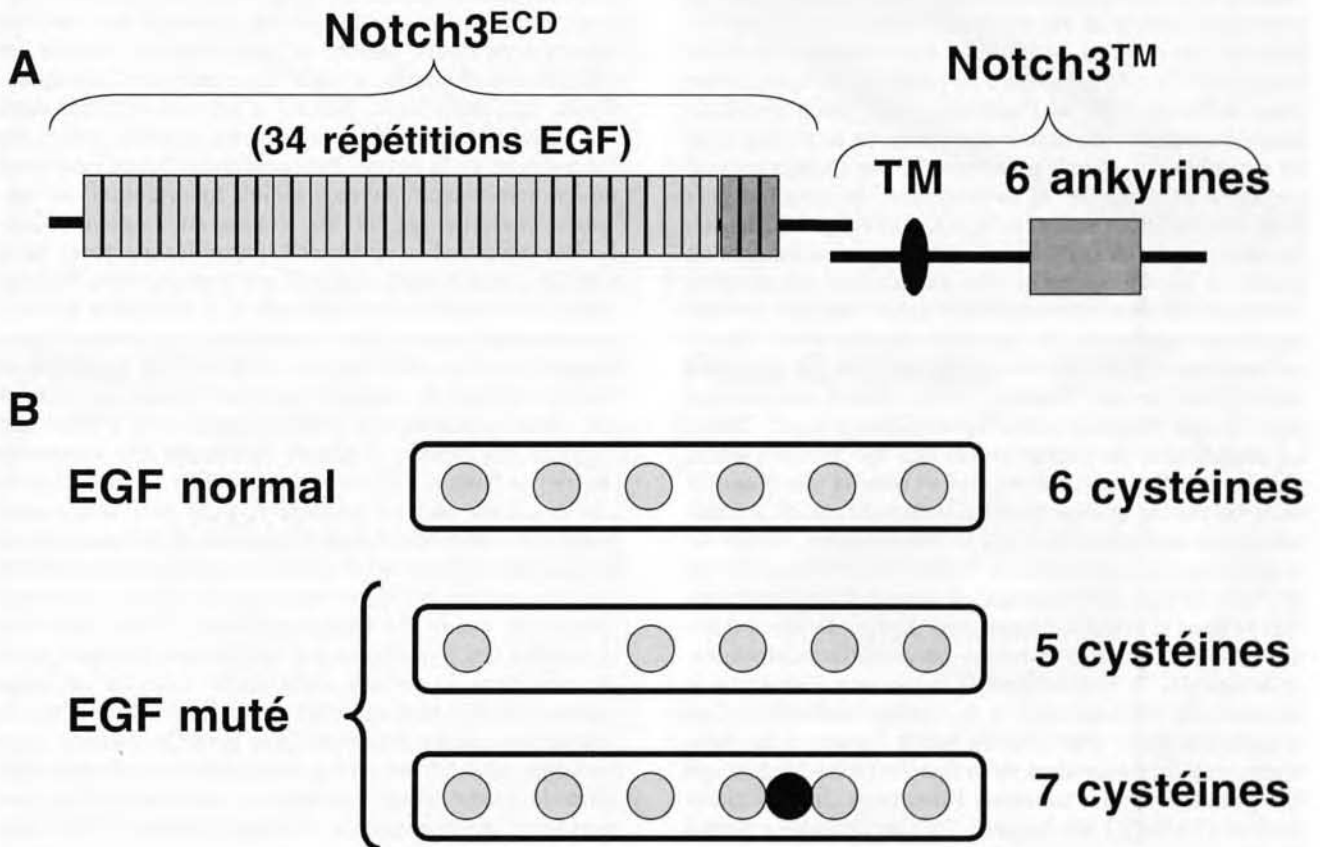


FIG. 2. – Représentation schématique de la protéine Notch3 et des mutations CADASIL.

A. Diagramme de la protéine Notch3 hétérodimérique (TM, domaine transmembranaire).

B. Représentation schématique d'un domaine EGF normal contenant 6 résidus cystéine et d'un domaine EGF muté contenant 5 ou 7 résidus cystéine.

(Artavanis-Tsakonas *et al.*, 1999). Le domaine extracellulaire de Notch3 comporte, quant à lui, 34 répétitions EGF. L'analyse d'un très grand nombre de patients CADASIL a révélé le caractère extrêmement stéréotypé des mutations. En effet, toutes les mutations identifiées à ce jour (des mutations faux sens pour l'essentiel et plus rarement des mutations d'un site d'épissage ou de petites délétions) conduisent, sans aucune exception, à la présence d'un nombre impair de cystéines dans un domaine EGF (Fig. 2). En outre, ces mutations sont fortement concentrées dans les 2 exons qui codent pour les 5 premiers domaines EGF (Joutel *et al.*, 1997; Oberstein *et al.*, 1999; Joutel *et al.*, 2000a; Dichgans *et al.*, 2000; Dichgans *et al.*, 2001).

L'implication du gène *Notch3* dans CADASIL fut une réelle surprise. En effet de nombreuses données expérimentales, obtenues pour une grande part chez la *Drosophile*, avaient révélé jusqu'alors que les récepteurs Notch étaient impliqués au cours du développement, dans la différenciation et la prolifération cellulaire et, dans certains cas, la mort cellulaire (pour revue, Artavanis-Tsakonas *et al.*, 1999). Ces travaux ont montré que Notch contrôlait la transduction des signaux d'inhibition latérale, processus dynamique servant à établir et stabiliser des différences d'identité au sein d'une population de cellules initialement homogènes et équipotentes. Un tel processus permet de régler dans l'espace et le temps la capacité des cellules de répondre à des signaux de différenciation. Ce rôle est illustré au cours de la neurogenèse chez la *Drosophile* où l'activation de Notch empêche toutes les cellules du neuro-ectoderme de se différencier en neuroblastes. Notch pourrait agir par un mécanisme similaire au cours de la neurogenèse du système nerveux central des vertébrés. Notch contrôle aussi la différenciation de très nombreux autres types cellulaires au cours du développement. En particulier, un nombre croissant de données expérimentales indique qu'une régulation appropriée de l'activité des récepteurs Notch est nécessaire pour le développement correct des vaisseaux (pour revue, Gridley, 2001). Notch contrôlerait entre autres l'identité artère veine (Zhong *et al.*, 2001). Le mécanisme de signalisation des récepteurs Notch, récemment disséqué, est original et permet une communication rapide et directe entre la membrane et le compartiment nucléaire (pour revue, Weinmaster, 2000). La maturation des récepteurs Notch fait intervenir un premier clivage protéolytique de leur domaine extracellulaire dans le réseau transgolgien. Après clivage, l'ectodomaine (N<sup>ECD</sup>) et le domaine transmembranaire-intracellulaire (N<sup>TM</sup>) restent liés de façon non covalente et forment un hétérodimère à la surface cellulaire. Les récepteurs Notch sont activés par la liaison à des protéines transmembranaires de la famille Delta-Jagged, qui comportent à ce jour au moins 5 membres chez les mammifères (Delta1, 3, 4; Jagged1-2). Ces ligands se lient à l'hétérodimère et stimulent l'activité de signalisation par un mécanisme impliquant 2 autres clivages protéolytiques séquentiels. Le premier clivage a lieu au niveau de l'extrémité N terminale de la sous-unité N<sup>TM</sup>, et aboutit à la séparation des sous-unités N<sup>ECD</sup> et N<sup>TM</sup>; il implique

une métalloprotéase. Le second clivage libère le domaine intracellulaire NICD (Notch Intra Cellular Domain) de la membrane qui migre ensuite dans le noyau; il implique les presenilins 1-2. NICD possède une activité de régulation transcriptionnelle, NICD se lie au facteur de transcription RBP-JK, favorisant ainsi la formation d'un complexe activateur de la transcription. Plusieurs gènes cibles ont été identifiés dont ceux de la famille *HES*. Ces données récentes sont tout à fait congruentes avec les observations anciennes qu'une activation de Notch, indépendante du ligand, pouvait être observée après délétion de l'ectodomaine du récepteur et que de telles versions de Notch se comportaient comme des récepteurs constitutivement actifs.

Afin de progresser dans la compréhension de la fonction du récepteur Notch3, dont on ignore tout à ce jour, nous avons étudié dans un premier temps son profil d'expression. Chez la souris, aux stades précoces du développement, l'expression de Notch3 est assez large, puis, à partir de E14.5 son expression se restreint progressivement aux vaisseaux. Dans les tissus adultes humains, l'expression de Notch3 est également restreinte aux vaisseaux. Dans le système nerveux central, l'expression de Notch3 est détectée dans les artères, les veines et les capillaires; dans les autres organes, Notch3 est détecté préférentiellement dans les artères. Dans le vaisseau, l'expression de Notch3 est restreinte aux cellules musculaires lisses, Notch3 n'étant détectée ni dans les cellules endothéliales, ni dans les cellules de l'adventice. Enfin, fait intéressant, Notch3 n'est pas exprimé dans les cellules musculaires viscérales comme celles de l'intestin ou de la vessie. Par conséquent Notch3 est donc une protéine spécifique de la cellule musculaire lisse vasculaire (Joutel *et al.*, 2000b). Nous avons également analysé la signalisation de Notch3. Parmi les membres de la famille Delta-Jagged, Jagged1 est exprimé dans le vaisseau, son expression est détectée à la fois dans les cellules endothéliales et dans les cellules musculaires lisses. Jagged1 est capable de lier et d'activer le récepteur Notch3 faisant de Jagged1 un des ligands de Notch3 (A. Joutel, résultats non publiés) mais il est à noter que Jagged1 est capable d'activer également les récepteurs Notch1 et Notch2 (Shimizu *et al.*, 2000). L'ensemble de ces résultats met en lumière le rôle non soupçonné jusqu'alors de Notch3 dans la biologie du vaisseau adulte et plus précisément de la cellule musculaire lisse. Fondé sur ce que l'on sait de la fonction des autres récepteurs Notch au cours du développement, il est possible d'émettre des hypothèses sur le rôle que pourrait jouer Notch3 dans la cellule musculaire lisse du vaisseau adulte. En effet bien qu'étant une cellule différenciée, la cellule musculaire lisse vasculaire garde la capacité, dans certaines circonstances physiologiques ou pathologiques dites de « remodelage vasculaire », de moduler son phénotype et de ré-entrer en division (Owens, 1995). Les expériences actuellement en cours devraient permettre de déterminer si Notch3 est effectivement impliqué dans le contrôle de la modulation phénotypique des cellules musculaires lisses vasculaires, à moins qu'elles ne révèlent une toute autre fonction de Notch3 dans ces cellules.

Afin de progresser dans la compréhension des mécanismes qui conduisent des mutations de ce récepteur au phénotype lésionnel de la cellule musculaire lisse, nous avons analysé dans un premier temps les conséquences des mutations sur la maturation et l'expression du récepteur Notch3. L'observation que toutes les mutations de type CADASIL aboutissent à un nombre impair de cystéines dans un domaine EGF suggérait que celles-ci pourraient affecter considérablement la conformation et/ou la maturation de ce récepteur. Le récepteur Notch3 sauvage subit une maturation identique à celle des autres récepteurs Notch. La protéine Notch3 entière (~ 280-kDa) est clivée en deux fragments de ~ 97 et ~ 210-kDa correspondant respectivement au domaine transmembranaire-intracellulaire (Notch3<sup>TM</sup>) et à l'ectodomaine (Notch3<sup>ECD</sup>). Ces deux sous-unités sont liées de façon non covalente et forment un hétérodimère à la surface cellulaire. Dans

des cellules en culture, les récepteurs portant une mutation de type CADASIL sont normalement clivés et exprimés à la membrane. En revanche, dans les tissus des patients CADASIL, il existe une accumulation anormale de la protéine Notch3. Cette accumulation est détectée dans les vaisseaux aussi bien du cerveau que des autres parenchymes. Elle siège à la membrane plasmique des cellules musculaires lisses vasculaires dans des zones très restreintes situées au contact immédiat des dépôts granulaires osmiophiles (Fig. 3) (Joutel *et al.*, 2000b). L'analyse des transcrits suggère très fortement que cette accumulation résulte non pas d'une augmentation de synthèse de la protéine ou d'une plus grande stabilité du transcrite mais plutôt d'une anomalie de la clairance de Notch3. Fait intéressant, seul l'ectodomaine de Notch3 s'accumule (Fig. 4). Cette observation pourrait suggérer que l'accumulation de Notch3 survient après la sépara-

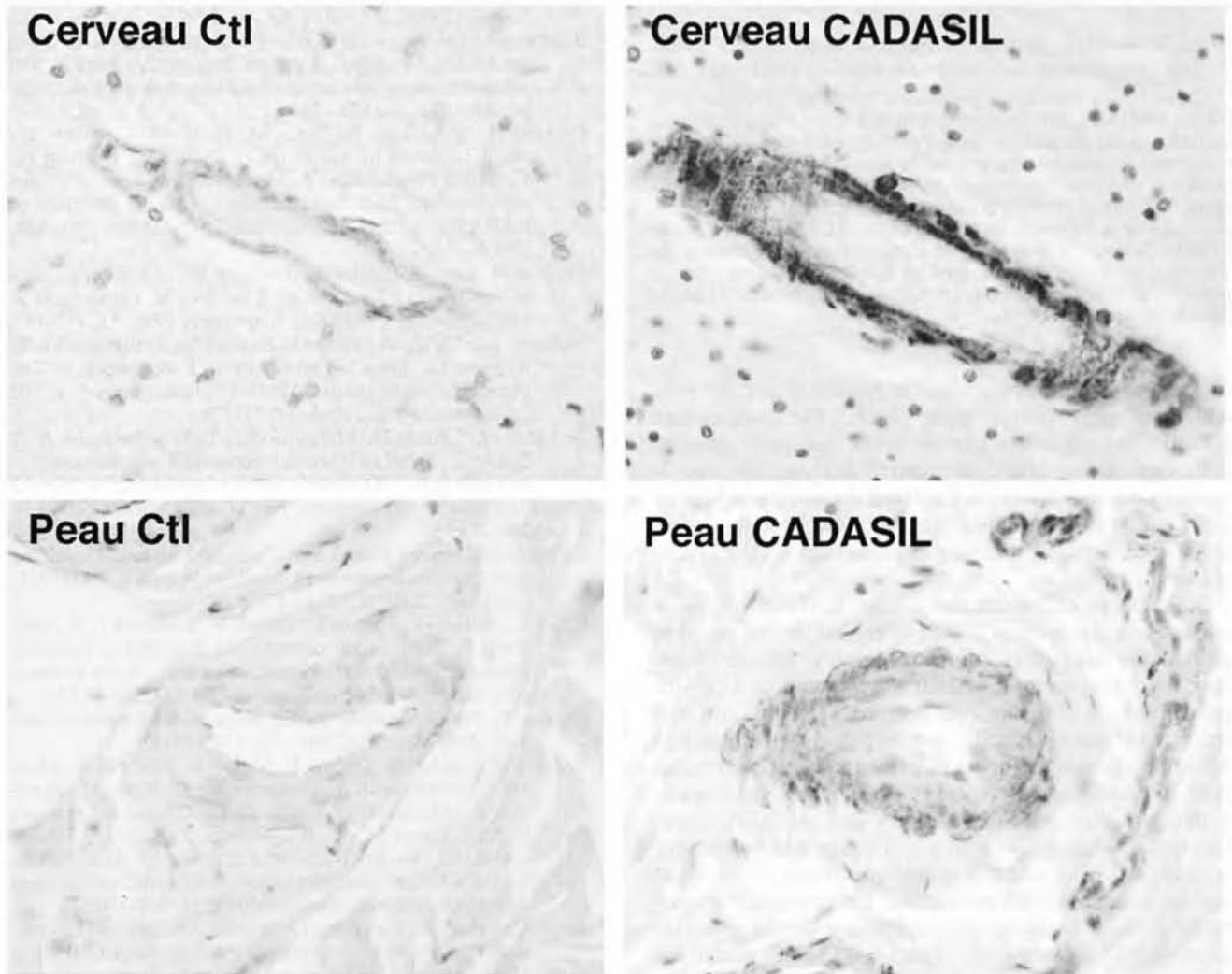


FIG. 3. – Expression de la protéine Notch3 chez des sujets normaux et chez des patients CADASIL.

Sections de cerveau et de peau de sujets témoins et de patients CADASIL incubées avec l'anticorps 1E4 (dirigé contre Notch3<sup>ECD</sup>). L'immunomarquage est restreint aux cellules musculaires lisses vasculaires : pâle chez les témoins alors qu'il est très intense et granulaire chez les patients CADASIL, reflétant l'accumulation anormale de la protéine Notch3.

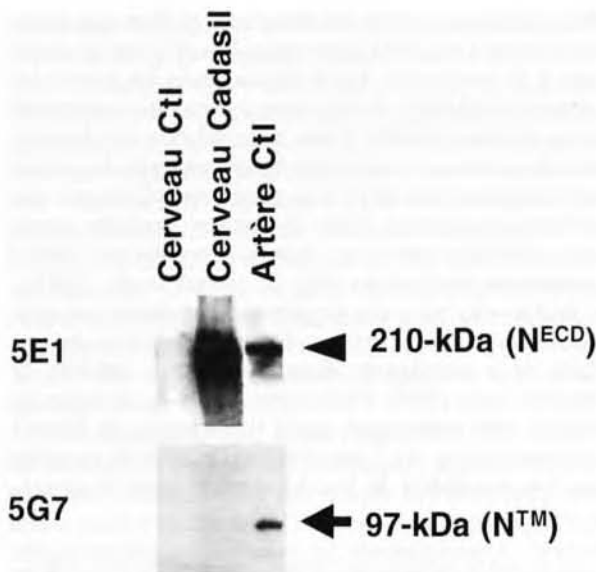


FIG. 4. – Accumulation sélective de l'ectodomaine de Notch3 dans les tissus CADASIL.

Des extraits protéiques préparés à partir de cerveaux d'un patient CADASIL et d'un sujet témoin et d'artère rénale d'un individu témoin ont été analysés sur gel SDS-PAGE 6 %, transférés sur membrane de nitrocellulose et incubés avec l'anticorps 5G7 (dirigé contre le domaine cytosolique de Notch3) ainsi qu'avec l'anticorps 5E1 (dirigé contre l'ectodomaine de Notch3). Notez la présence des deux fragments de clivage de 210-kDa (Notch3<sup>ECD</sup>) et de 97-kDa (Notch3<sup>TM</sup>) dans le lysat d'artère normale, l'absence de fragment détectable dans le cerveau normal contrastant avec la présence en quantité très abondante du seul fragment de 210-kDa dans le cerveau CADASIL.

tion des sous-unités Notch3<sup>ECD</sup> et Notch3<sup>TM</sup> et donc probablement après l'activation de Notch3. Des travaux sont actuellement en cours afin de confirmer ou d'infirmer cette hypothèse, afin également d'analyser les conséquences des mutations sur l'activité du récepteur Notch3 ainsi que la responsabilité éventuelle de l'accumulation de Notch3 dans le processus lésionnel des cellules musculaires.

Au début de ce nouveau millénaire, CADASIL émerge comme une cause bien définie et probablement pas rare de maladie des petites artères cérébrales. Encore inconnue, il y a un peu moins de 10 ans, on compte à ce jour pas moins de 400 familles atteintes. De plus, on sait maintenant que CADASIL peut se présenter comme une affection sporadique liée à la présence de néo-mutation dans le gène *Notch3* (Joutel *et al.*, 2000c). On dispose depuis peu d'un outil diagnostique de CADASIL extrêmement performant, offrant à la fois une très bonne sensibilité (> 95 %), une très bonne spécificité (> 95 %) et surtout une faisabilité en routine. La stratégie diagnostique combine le séquençage direct de 2 des 33 exons du gène *Notch3* où sont concentrées ~ 65 % des mutations et l'analyse immunohistochimique de biopsie de peau à l'aide d'un anticorps anti-Notch3 visant à mettre en évidence une accumulation anormale de la protéine Notch3 (Joutel *et al.*, 2001). Cet outil diagnostique permettra, dans un avenir proche, de déterminer la prévalence

exacte de CADASIL, première étape dans le démembrement du groupe probablement très hétérogène des maladies des petites artères cérébrales.

Nul doute qu'il reste encore beaucoup de chemin à parcourir avant de trouver les clefs qui permettront de comprendre les mécanismes physiopathogéniques de CADASIL ainsi que des autres maladies des petites artères cérébrales et enfin de mettre en œuvre les thérapeutiques adéquates. Mais il semble bien que les travaux de recherche menés sur CADASIL constituent une avancée significative et surtout qu'ils offrent de nouvelles et fascinantes perspectives de recherche dans ce domaine des artériopathies cérébrales.

## BIBLIOGRAPHIE

- Artavanis-Tsakonas S., Rand M. D. & Lake R.J., Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science*, 1999, 284, 770-776.
- Baudrimont M., Dubas F., Joutel A., Tournier-Lasserre E. & Bousser M. G., Autosomal dominant leukoencephalopathy and subcortical ischemic stroke. A Clinicopathological study. *Stroke*, 1993, 24, 122-125.
- Chabriat H., Vahedi K., Iba-Zizen M. T., Joutel A., Nibbio A., Nagy T., Krebs M. O., Julien J., Dubois B., Ducrocq X., Levasseur M., Homeyer P., Mas J. L., Lyon-Caen O., Tournier-Lasserre E. & Bousser M. G., Clinical spectrum of CADASIL: a study of 7 families. *Lancet*, 1995, 346, 934-939.
- Chabriat H., Levy C., Taillia H., Iba-Zizen M. T., Vahedi K., Joutel A., Tournier-Lasserre E. & Bousser M. G., Patterns of MRI lesions in CADASIL. *Neurology*, 1998, 51, 452-457.
- Dichgans M., Mayer M., Uttner I., Bruning R., Muller-Hocker J., Rungger G., Ebke M., Klockgether T. & Gasser T., The phenotypic spectrum of CADASIL: clinical findings in 102 cases. *Ann Neurol*, 1998, 44, 731-739.
- Dichgans M., Ludwig H., Muller-Hocker J., Messerschmidt A. & Gasser T., Small in-frame deletions and missense mutations in CADASIL: 3D models predict misfolding of Notch3 EGF-like repeat domains. *Eur. J. Hum. Genet.*, 2000, 4, 280-285.
- Dichgans M., Herzog J. & Gasser T., Notch3 mutation involving three cysteine residues in a family with typical CADASIL. *Neurology*, 2001, 57, 1714-1717.
- Elbaz A., Poirier O., Moulin T., Chedru F., Cambien F. & Amaranco P., Association between the Glu298Asp polymorphism in the endothelial constitutive nitric oxide synthase gene and brain infarction. *Stroke*, 2000, 31, 1634-1639.
- Gridley T., Notch signaling during vascular development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001, 98, 5377-5378.
- Joutel A., Corpechot C., Ducros A., Vahedi K., Chabriat H., Mouton P., Alamowitch S., Domenga V., Cccillion M., Marchal E., Maciazek J., Vayssiere C., Cruaud C., Cabanis E. A., Ruchoux M. M., Weissenbach J., Bach J. F., Bousser M. G., Tournier-Lasserre E., *Notch3* mutations in CADASIL, an hereditary adult-onset condition causing stroke and dementia. *Nature*, 1996, 383, 707-710.
- Joutel A., Vahedi K., Corpechot C., Troesch A., Chabriat H., Vayssiere C., Cruaud C., Maciazek J., Weissenbach J., Bousser M. G., Bach J. F. & Tournier-Lasserre E., Strong clustering and stereotyped nature of Notch3 mutations in CADASIL patients. *Lancet*, 1997, 350, 1511-1515.
- Joutel A., Chabriat H., Vahedi K., Domenga V., Vayssiere C., Ruchoux M. M., Lucas C., Leys D., Bousser M. G. & Tournier-Lasserre E., Splice site mutation causing a seven amino

- acid Notch3 in-frame deletion in CADASIL. *Neurology*, 2000a, 54, 1874-1875.
- Joutel A., Andreux F., Gaulis S., Domenga V., Cecillon M., Batail N., Piga N., Chapon F., Godfrain C. & Tournier-Lasserre E., The ectodomain of the Notch3 receptor accumulates within the cerebrovasculature of CADASIL patients. *J. Clin. Invest.*, 2000b, 105, 597-605.
- Joutel A., Dodick D. D., Parisi J. E., Cecillon M., Tournier-Lasserre E. & Bousser M. G., De novo mutation in the Notch3 gene causing CADASIL. *Ann. Neurol.*, 2000c, 47, 388-391.
- Joutel A., Favrole P., Labauge P., Chabriat H., Lescoat C., Andreux F., Domenga V., Cécillon M., Vahedi K., Ducros A., Cave-Riant F., Bousser M. G. & Tournier-Lasserre E., Evaluation of skin biopsy immunostaining with a Notch3 monoclonal antibody for CADASIL diagnosis. *Lancet*, 2001, 358, 2049-2051.
- Oberstein S. A., Ferrari M. D., Bakker E., van Gestel J., Kneppers A. L., Frants R. R., Breuning M. H., Haan J., Diagnostic Notch3 sequence analysis in CADASIL: three new mutations in Dutch patients. Dutch CADASIL Research Group. *Neurology*, 1999, 52, 1913-1915.
- Owens G. K., Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells. *Physiol. Rev.*, 1995, 75, 487-517.
- Ruchoux M. M., Guerouaou D., Vandenhaute G., Pruvo J. P., Vermesch P. & Leys D., Systemic vascular smooth muscle cell impairment in cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy. *Acta Neuropathol.*, 1995, 89, 500-512.
- Ruchoux M. M. & Muraige C. A., CADASIL: cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 1997, 56, 947-964.
- Shimizu K., Chiba S., Hosoya N., Kumano K., Saito T., Kurokawa M., Kanda Y., Hamada Y., Hirai H., Binding of Delta1, Jagged1, and Jagged2 to Notch2 rapidly induces cleavage, nuclear translocation, and hyperphosphorylation of Notch2. *Mol. Cell Biol.*, 2000, 20, 6913-622.
- Tournier-Lasserre E., Iba-Zizen M. T., Romero N. & Bousser M. G., Autosomal dominant syndrome with stroke like episodes and leukoencephalopathy. *Stroke*, 1991, 22, 1297-302.
- Tournier-Lasserre E., Joutel A., Melki J., Weissenbach J., Lathrop G. M., Chabriat H., Mas J. L., Cabanis E. A., Baudrimont M., Maciazek J., Bach M. A. & Bousser M. G., Cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy maps to chromosome 19q12. *Nature Genet.*, 1993, 3, 256-259.
- Weinmaster G., Notch signal transduction: a real rip and more (review). *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 2000; 10; 363-369.
- Zhong T. P., Childs S., Leu J. P., Fishman M. C., Gridlock signaling pathway fashions the first embryonic artery. *Nature*, 2001, 414, 216-220.