

Les gènes qui font l'identité endothéliale

Alexandra Le Bras et Fabrice Soncin

Institut de Biologie de Lille, CNRS UMR8161, Équipe Labellisée Ligue Nationale contre le Cancer 2008, Université de Lille I, Université de Lille II, Institut Pasteur de Lille, 1, rue Calmette, 59021 Lille Cedex, France

Auteur correspondant : Fabrice Soncin, fabrice.soncin@ibl.fr

Reçu le 10 janvier 2009

Résumé – L'endothélium forme un tissu qui possède une identité propre due à l'expression spécifique de marqueurs moléculaires par les cellules endothéliales. L'endothélium présente d'autre part une hétérogénéité de structure qui est illustrée par l'expression de marqueurs spécifiques des artères ou des veines. Nous présentons ici une revue des mécanismes de régulation transcriptionnelle et épigénétique des principaux marqueurs des cellules endothéliales chez l'Homme et la souris qui démontre qu'il n'existe pas de mécanisme commun et unique d'expression spécifique de gènes dans ces cellules.

Mots clés : Angiogenèse / endothélium / régulation de gène / transcription / épigénétique

Abstract – Genes that make the endothelial identity.

The endothelium is a tissue with a distinct identity due to the specific expression of molecular markers by endothelial cells. Further, the endothelium displays a structural heterogeneity illustrated by the expression of specific markers in arteries and in veins. Here, we present a review of the transcriptional and epigenetic mechanisms regulating the expression of the main markers of endothelial cells in man and mouse, demonstrating that there is no common and unique mechanism of specific expression of genes in these cells.

Key words: Angiogenesis / endothelium / gene regulation / transcription / epigenetics

L'endothélium est la couche de tissu monocellulaire qui recouvre la surface interne des vaisseaux sanguins, directement au contact du sang. Une de ses caractéristiques principales est d'être non-thrombotique à l'état normal et de former, dans sa grande majorité, une barrière sélective d'échanges entre le sang et les organes irrigués. L'endothélium se distingue par un ensemble de molécules parmi lesquelles on trouve essentiellement des protéines membranaires, marqueurs spécifiques ou quasi spécifiques de l'endothélium vasculaire, telles que Flk-1/VEGFR-2, Tie-2, CD31/PECAM, eNOS ou VE-cadhérine. Cependant, l'identité endothéliale n'est pas aussi simplement définie, dans la mesure où l'endothélium présente aussi une variété de formes selon son origine et sa localisation tissulaire. En effet, au cours du développement, le plexus vasculaire initialement formé est remodelé pour donner naissance à un arbre com-

plexe et hétérogène fait de gros vaisseaux, les artères et les veines, et de plus petits vaisseaux, les artérioles, les veinules et les capillaires. La différenciation artérioveineuse s'effectue très précocement chez l'embryon, juste après la mise en place du flux sanguin. La différenciation artérielle ou veineuse se manifeste par la mise en place de différents marqueurs qui sont spécifiques de ces deux systèmes, parmi lesquels se trouvent les protéines membranaires de la famille EphrinB et leurs récepteurs EphB et les récepteurs de la famille des neuropilines Nrp-1 et Nrp-2. L'EphrinB2 et Nrp-1 sont des marqueurs du système artériel alors qu'EphB4 et Nrp-2 sont des marqueurs veineux. La voie Notch est également déterminante dans la mise en place et le maintien du phénotype artériel. Chez le poisson-zèbre, l'inhibition de cette voie empêche la mise en place du marqueur artériel EphrinB2 et son activation entraîne une perte d'expression des

marqueurs veineux EphB4 et Flt4 (Lawson *et al.*, 2001). De même, chez la souris, l'inactivation des gènes cibles de Notch-1, Hey1 et Hey2 ou du gène Dll4 entraîne la perte des marqueurs artériels au niveau des cellules endothéliales (Fischer *et al.*, 2004; Duarte, 2004). D'autre part, l'expression chez la souris adulte d'un transgène codant pour la forme activée du récepteur Notch-4 entraîne une artérialisation des vaisseaux qui se manifeste par l'apparition ectopique du marqueur artériel EphrinB2 dans les cellules endothéliales veineuses (Carlson *et al.*, 2005).

Régulation transcriptionnelle dans l'endothélium

Bien avant de pouvoir étudier les mécanismes transcriptionnels qui dirigent l'expression spécifique de molécules dans chaque type d'endothélium, l'identification des mécanismes de base qui restreignent l'expression à la cellule endothéliale des marqueurs les plus répandus parmi ces cellules reste un sujet d'actualité. Il faut immédiatement remarquer qu'aucun facteur de transcription capable de diriger seul l'expression spécifique de gènes dans les cellules endothéliales n'a encore été identifié. Cependant, l'analyse des patrons d'expression au cours du développement normal et pathologique ainsi que les phénotypes induits consécutivement à l'inactivation du gène de certains facteurs de transcription ont permis de mettre en évidence certains facteurs importants pour l'endothélium. C'est le cas des gènes de la famille des facteurs de transcription ETS tels que Fli-1, Ets-1 et Erg ou le répresseur Net, notamment, mais aussi d'autres facteurs tels que ceux de la famille GATA, Lmo2, Scl/Tal-1 ou COUP-TFII pour la différenciation veineuse.

Les mécanismes de régulation des gènes dans les cellules endothéliales et les lignées hématopoïétiques présentent des mécanismes et des facteurs de transcription communs, ce qui pourrait s'expliquer par l'origine embryonnaire supposée commune de leurs progéniteurs : les hémangioblastes. Le facteur de transcription Scl/Tal-1 est un acteur majeur de la différenciation des diverses lignées hématopoïétiques (Robb *et al.*, 1996). Il s'exprime préférentiellement dans les cellules souches sanguines mais son expression est également retrouvée dans les angioblastes et dans les cellules endothéliales matures (Kallianpur *et al.*, 1994). L'inhibition de l'expression de Scl/Tal-1 par inactivation du gène confirme son rôle essentiel dans la différenciation des cellules hématopoïétiques ; de plus l'absence d'angiogenèse dans le sac vitellin d'embryons de souris *Tal1*^{-/-}, chez qui l'expression du facteur a été restaurée dans les cellules hématopoïétiques primitives, établit un lien entre ce facteur et la forma-

tion des vaisseaux sanguins (Visvader *et al.*, 1998). Dans le cadre de la régulation hématopoïétique, ce facteur interagit avec les partenaires GATA-1 et GATA-2 ou le facteur de transcription Lmo2 en complexes multi-protéiques. (Wadman *et al.*, 1997). L'expression des facteurs Scl/Tal-1 et Lmo2 est elle-même régulée par des membres de la famille ETS : les facteurs Fli-1 et Elf-1 agissent sur un *enhancer* (une région capable d'activer la transcription du gène de façon autonome, indépendamment d'une orientation ou d'un positionnement défini par rapport au promoteur (Laumonier *et al.*, 2000)) situé dans la région 3' du gène *Scl/Tal-1* qui dirige son expression dans les cellules souches hématopoïétiques et dans les cellules endothéliales (Wadman *et al.*, 1997). Les facteurs Fli-1 et Elf-1 régulent également, en association avec Ets-1, le promoteur proximal de Lmo2 (Landry *et al.*, 2005). Fli-1 semble jouer un rôle central dans la différenciation hématopoïétique et endothéliale au cours du développement dans la mesure où son inactivation chez le xénope ou le poisson-zèbre induit une forte réduction ou une absence d'hémangioblastes et où sa surexpression permet l'induction de facteurs clés pour cette différenciation, tels Scl/Tal-1, Lmo2, GATA2 ou Flk-1 (Liu *et al.*, 2008).

Les promoteurs endothéliaux

La régulation spécifique de l'expression des gènes dans les cellules endothéliales est conditionnée par la présence de régions de régulation dans le promoteur proximal et dans la séquence du gène et par les interactions de ces différentes régions entre elles. Ces régions conditionnent l'expression spécifique, soit en favorisant l'expression dans les cellules endothéliales, soit en inhibant la transcription du gène dans les cellules non-endothéliales.

Le gène *Flt-1*

Le gène *Flt-1* est essentiellement exprimé dans les cellules endothéliales, il code pour un des récepteurs au VEGF. L'expression de ce gène est détectée à partir de 8,5 j de développement embryonnaire, puis dans les cellules endothéliales impliquées dans les processus de vasculogenèse et d'angiogenèse (Millauer *et al.*, 1993). L'expression diminue chez l'adulte mais elle est réactivée lors de l'angiogenèse physiologique (Mochida *et al.*, 1996) ou tumorale (Plate *et al.*, 1993). Son expression est également détectée dans les macrophages (Akuzawa *et al.*, 2000) et au niveau du trophoblaste (Shore *et al.*, 1997). Le promoteur humain contient une boîte TATA et une région riche en GC ; le site d'initiation de la transcription a été localisé 25 pb en

aval de la boîte TATA (Morishita *et al.*, 1995). L'analyse d'un fragment de promoteur [-2,5/+284] a permis de localiser une région impliquée dans l'expression spécifique du gène dans les cellules endothéliales située dans les 200 pb en amont du premier exon (Wakiya *et al.*, 1996). Un site de réponse à l'AMPc ou au calcium (*c-AMP* or *calcium responsive element*, CRE) en position [-83/-76] et un site de fixation des facteurs ETS (*ETS-binding site*, EBS) en position [-54/-51] sont impliqués dans la régulation de cette région, la mutation de chacun de ces sites diminuant de 90 % l'activité du promoteur proximal dans les cellules endothéliales. Des expériences de transactivation avec les facteurs Ets-1, Ets-2 et Erg ou de mutagenèse ont montré que les membres de la famille ETS étaient impliqués dans la régulation et que les deux motifs EBS et CRE étaient nécessaires pour que cette transactivation ait lieu (Wakiya *et al.*, 1996). Le facteur Ets-1 pourrait être un bon candidat; en effet, une corrélation significative de l'expression de *Ets-1* et de *Flt-1* a été observée dans les cellules endothéliales de gliomes humains (Valter *et al.*, 1999). Une coopération entre Ets-1 et HIF-2 α a aussi récemment été observée pour l'activation de ce gène dans les cellules endothéliales en dehors du contexte hypoxique (Dutta *et al.*, 2008).

Le gène *Tie-1*

L'expression du gène *Tie-1* est détectée à 8,5 j de développement embryonnaire dans les angioblastes du mésenchyme de la tête, au niveau de l'aorte et dans les îlots sanguins primitifs du sac vitellin. Le gène est exprimé de façon uniforme dans les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins de l'embryon tout au cours du développement. Son expression persiste chez l'adulte dans les vaisseaux du poumon mais diminue dans le cœur et dans le cerveau. Ce gène est réactivé lors de l'angiogenèse physiologique comme lors de la cicatrisation, et tumorale dans les glioblastomes et les mélanomes. Le gène murin est codé par 33 exons qui s'étendent sur 19 kb. Le promoteur du gène ne contient pas de boîte TATA, ni de boîte CAAT (Korhonen *et al.*, 1995). Plusieurs sites d'initiation de la transcription ont été localisés dont deux sites majeurs dans les régions appelées P1 et P2 (Iljin *et al.*, 1999). Les promoteurs humain et murin présentent des séquences à forte homologie dans les 900 pb en amont du site d'initiation de la traduction (Korhonen *et al.*, 1995).

Entre 8 j et 8,5 j de développement, le fragment de 735pb AflII/ApaI du promoteur souris permet une expression du gène LacZ placé en aval dans les cellules endothéliales de l'aorte dorsale, du cœur, et dans les artères vitellines *in vivo*, certaines cellules sanguines étant provisoirement marquées. Puis l'expres-

sion du gène LacZ s'étend aux cellules endothéliales de tout l'embryon au cours du développement, le profil observé correspondant alors à celui obtenu lors de la détection des ARNm Tie-1 par hybridation *in situ*. Tout comme le gène endogène, l'expression de ce rapporteur diminue dans certains organes comme le cerveau chez les souris adultes. L'utilisation d'un fragment de 5kb du promoteur humain restitue le même profil (Korhonen *et al.*, 1995). L'activité de cette région de 735 pb est conditionnée par l'existence dans une séquence interne de 300 pb d'un doublet de sites EBS dans chacune des régions P1 et P2 et d'une séquence octamère, séquence normalement reconnue par des membres de la famille POU. Un site AP2 dans cette région pourrait également intervenir dans la régulation. Le rôle primordial du doublet de sites EBS de la région P2 a été démontré *in vitro* et *in vivo*, la mutation de ce site provoquant une chute de l'expression du gène LacZ dans les embryons transgéniques où seuls quelques vaisseaux apparaissent marqués. La mutation de chacun des doublets de P1 et P2 abolit la transactivation par les facteurs Nerf-2, Ets-1 et Ets-2 qui était observée et éteint complètement l'activité du promoteur dans les cellules endothéliales (Iljin *et al.*, 1999).

Le gène *Robo-4*

La protéine ROBO-4 appartient à la famille des récepteurs 'Roundabout' dont les trois premiers membres sont impliqués dans le guidage axonal et la migration des cellules neurales par leur interaction avec les ligands Slit. Le gène *Robo-4* est le seul membre de cette famille qui soit spécifiquement exprimé dans les cellules endothéliales de l'embryon (Park *et al.*, 2003) et de l'adulte. Son expression est également détectée lors de l'angiogenèse tumorale (Huminiacki *et al.*, 2002). Le promoteur du gène humain ne possède pas de boîte TATA et le site d'initiation de la transcription a été localisé à 37 pb en amont du codon d'initiation de la traduction (Okada *et al.*, 2007). Le fragment de promoteur humain de 3 kb situé en amont du site d'initiation de la transcription permet une expression spécifique du gène dans les cellules endothéliales *in vitro* et *in vivo*. En effet, le profil d'expression LacZ obtenu avec ce fragment de promoteur correspond à un marquage des cellules endothéliales de l'embryon et de l'adulte dans tous les organes. Le marquage n'est pas uniforme, les petits vaisseaux étant par exemple généralement plus marqués que les gros. Ce profil d'expression est le même que celui observé dans les expériences de 'knock-in' où le gène LacZ est placé dans le locus *Robo-4* sous le contrôle du promoteur endogène. L'analyse *in vitro* montre que l'ensemble de la région promotrice participe à

l'expression préférentielle du gène dans les cellules endothéliales, mais deux régions semblent contribuer plus majoritairement à la spécificité endothéliale : le promoteur proximal et la région [-2550/-2516] (Okada *et al.*, 2007). La région [-285/ +40] du gène *Robo-4* est fortement conservée entre les espèces rat, souris et Homme, ce qui suggère que la régulation de cette région pourrait être sous le contrôle d'un mécanisme conservé. L'activité du promoteur proximal nécessite la présence de deux sites de fixation du facteur Sp1 en -153 et -42 et, surtout, d'un site EBS en -119. Le facteur Sp1 est capable de transactiver le promoteur de 3 kb et la mutation de ses deux sites de fixation abolit la transactivation observée. D'autre part, le facteur GABP, un membre de la famille ETS, interviendrait au niveau du site EBS. Ce facteur se fixe sur les régions promotrices sous forme d'hétérodimère GABP- α avec l'unité β ou γ . C'est la première fois que ce facteur est décrit comme intervenant dans la régulation d'un gène marqueur des cellules endothéliales, son implication ayant été par ailleurs décrite dans la régulation de gènes des lymphocytes ou des cellules myéloïdes (Shimokawa *et al.*, 2005). La mutation du site EBS -119 dans le locus du gène *Robo4* entraîne une forte diminution d'expression du gène *in vivo*, ce qui démontre l'importance de ce site dans la régulation du gène dans les cellules endothéliales (Okada *et al.*, 2008).

Les gènes comportant un *enhancer intronique*

Le gène *Flk-1*

Le gène *Flk-1* (*fetal liver kinase-1*) est un des marqueurs les plus précoces des cellules endothéliales, il code pour un récepteur au VEGF. Il est exprimé dès 7,5 jours de développement dans les îlots sanguins primitifs du sac vitellin et au niveau du mésoderme de l'embryon, dans le territoire où se différencie le cœur. Au cours de l'organogenèse, son expression se retrouve ensuite spécifiquement dans les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins issus des processus de vasculogenèse et d'angiogenèse (Yamaguchi *et al.*, 1993). Son expression est, par la suite, fortement diminuée chez l'adulte (Millauer *et al.*, 1993) et elle n'est réactivée que lors de la formation de nouveaux vaisseaux sanguins au cours de processus physiologiques ou pathologiques comme l'angiogenèse tumorale observée dans les glioblastomes (Plate *et al.*, 1993). La région 5' du gène *flk-1* murin comporte un seul site d'initiation de la transcription. Le promoteur ne comporte pas de boîte TATA ou CAAT mais une séquence riche en C et T, dont l'organisation est similaire à l'élément initiateur (PyPyAT/APyPy) avec, notamment, la présence

de plusieurs sites potentiels de fixation pour le facteur Sp1 dans son environnement immédiat (Ronicke *et al.*, 1996). L'analyse de l'activité transcriptionnelle de fragments du promoteur a montré que le fragment [-1900/ +299] favorise l'expression d'un gène rapporteur dans les cellules endothéliales, notamment grâce à la région [+137/+299] qui correspond à la région 5' non-traduite du premier exon et qui contient un élément de régulation positive (Ronicke *et al.*, 1996). L'analyse *in vivo* a montré que cette région était importante pour l'expression de *Flk-1* dans les cellules endothéliales du sac vitellin (Kappel *et al.*, 1999). Deux régions négatives entre -4100 et -623 participent également à l'expression spécifiquement endothéliale en diminuant l'activité du gène dans les cellules non-endothéliales (Ronicke *et al.*, 1996). L'analyse *in vitro* du promoteur du gène homologue humain KDR ('*kinase domain-containing receptor*') a, de la même façon, permis de localiser l'initiation de la transcription dans une région dépourvue de boîte TATA, mais riche en sites Sp1. Le facteur Sp1 est un facteur de transcription décrit comme un activateur qui faciliterait le recrutement de la machinerie transcriptionnelle sur les séquences des promoteurs qui ne disposent pas de boîte TATA (Pugh *et al.*, 1991). La localisation des régions de régulation diffère de celle du promoteur murin. Deux régions de régulation positives spécifiquement endothéliales ont en effet été localisées en [-225/-164] et [-95/-77] (Patterson *et al.*, 1995).

Les espèces murines et humaines pourraient néanmoins partager des mécanismes communs pour la régulation de leur promoteur proximal qui contient dans les deux cas des sites de fixation pour plusieurs facteurs Sp1, AP2 et NFkB (Patterson *et al.*, 1997). Le promoteur proximal humain a été étudié pour sa capacité à fixer Sp1 par des expériences d'empreinte à la DNase. Le profil d'empreinte dans des cellules endothéliales est similaire au profil de fixation de Sp1 *in vitro*, à savoir quatre sites Sp1 localisés entre -110 et -25. Dans des cellules non-endothéliales, le profil de protection obtenu est très différent et répétitif. Il pourrait s'expliquer soit par la fixation de facteurs différents sur la séquence dans les cellules non-endothéliales, soit par l'enroulement de l'ADN autour des nucléosomes qui ne seraient déplacés que dans les cellules endothéliales pour permettre la fixation de Sp1 (Patterson *et al.*, 1997). Un remaniement de la chromatine dépendant du type cellulaire pourrait donc intervenir dans la régulation du gène. L'étude du promoteur proximal murin a montré que deux sites EBS, appelés EBS-3 et EBS-6, pouvaient être activés par Ets-1 *in vitro* et que la mutation du site EBS-3 diminue fortement l'expression dirigée par le promoteur dans les cellules endothéliales *in vivo* et *in vitro* (Kappel *et al.*, 2000). Ces deux sites EBS sont impliqués dans la coopération qui s'opère au niveau du

promoteur proximal entre le facteur Ets-1 et le facteur HIF-2 α . Deux sites apparentés au motif de réponse à l'hypoxie ('*hypoxia response element*', HRE) sont en effet localisés à -120 et -78, à proximité de chacun des deux EBS et les deux facteurs agissent en synergie : le facteur HIF-2 α facilite la fixation de Ets-1 sur la séquence promotrice, les deux facteurs agissent alors en coopération pour transactiver le promoteur proximal de *Flk-1*. La mutation des deux tandems HRE/EBS dans un transgène abolit l'expression du gène rapporteur dans les cellules endothéliales *in vivo* (Elvert *et al.*, 2003).

D'autres expériences *in vivo* ont montré que, contrairement à ce qui avait été observé au cours de l'analyse *in vitro*, le fragment [-1900/+299] de promoteur murin est insuffisant pour diriger une expression endothéliale satisfaisante et reproductible du gène rapporteur LacZ chez la souris. Des séquences de régulation supplémentaires sont donc nécessaires *in vivo*. L'ajout de 2,3 kb de la partie 3' de l'intron 1 [+1677/+3947] au promoteur [-640/+299] dans un transgène a permis d'obtenir une expression forte et reproductible du gène rapporteur dans les cellules endothéliales des vaisseaux de la tête, des vaisseaux intersomitiques, de l'aorte dorsale, et de l'endocarde. Le profil d'expression endogène du gène *Flk-1* est donc respecté avec cette séquence et ce, à différents stades du développement, puisque l'on retrouve l'expression du rapporteur dès 7,8 j dans les angioblastes du sac vitellin et dans les cellules endothéliales de tous les stades entre 7,8 et 14,5 j. Tout comme dans le profil d'expression du gène *Flk-1*, cinq jours après la naissance, on voit une diminution de l'expression du rapporteur dans la majeure partie des organes. Cet intron agit comme un '*enhancer*' mais il doit cependant être associé à d'autres éléments positifs de régulation de la transcription présents dans le promoteur pour restituer le profil du gène endogène en transgénèse. Cet *enhancer* correspond aux 510 pb [+3437/+3947] situées juste en amont du second exon (Kappel *et al.*, 1999) et les facteurs susceptibles d'intervenir dans sa régulation ont été analysés : deux sites Scl/Tal-1 sont fondamentaux et la mutation d'un site GATA rend l'*enhancer* complètement inactif *in vivo*. Les cellules endothéliales expriment majoritairement GATA-2, mais aussi GATA-3, GATA-4 et GATA-5. Le facteur GATA-2 intervient dans la régulation du gène endothélial de la préproendothéline (Dorfman *et al.*, 1992) et on a montré qu'il pouvait transactiver le promoteur proximal du gène *ICAM-2* (Cowan *et al.*, 1998). L'*enhancer* du gène *Flk-1* contient donc des séquences de régulation pour deux facteurs de transcription impliqués dans la différenciation hématopoïétique, les facteurs Scl/Tal-1 et GATA-2 et pour la famille ETS (Kappel *et al.*, 2000). De façon intéressante, l'expression du gène *Flk-1* a été

détectée dès 7 j de développement embryonnaire dans les cellules du mésoderme avant la formation des îlots sanguins, ses mécanismes de régulation suggèrent donc fortement qu'il pourrait être un marqueur des hémangioblastes. Cependant, l'expression de *Flk-1* est régulée négativement par Runx1, directement au niveau de son promoteur, un mécanisme probablement à l'origine de l'arrêt d'expression de *Flk-1* dans les cellules hématopoïétiques (Hirai *et al.*, 2005).

Chez le poisson-zèbre (*Danio rerio*), l'analyse des 6,4 kb de la région promotrice située en 5' du site d'initiation de la traduction montre que cette séquence permet de restituer le profil d'expression endogène de *Flk-1* au début du développement mais que cette région ne contient pas les éléments responsables de la disparition d'expression chez l'adulte. Par découpage, un *enhancer* [-4353/-3543] a pu être localisé qui dirige l'expression dans les cellules endothéliales mais aussi dans certains autres types cellulaires dans le cerveau et les yeux. Un fragment supplémentaire [-5045 /-4325] est nécessaire *in vivo* pour réduire l'expression aux cellules endothéliales et contient des sites de fixation putatifs pour les répresseurs engrailed, pbx, brn-3 qui sont exprimés dans le cerveau et les yeux. Tout comme l'*enhancer* murin, la région [-4353/-3543] contient de nombreux sites potentiels de fixation pour les facteurs Scl/Tal-1, GATA et les membres de la famille ETS, ce qui peut suggérer un mécanisme de régulation conservé. (Choi *et al.*, 2007).

Le gène *Tie-2*

L'expression de *Tie-2* est détectée dans les îlots sanguins primitifs du mésoderme extra-embryonnaire dès 7,5 j de développement. Son expression est ensuite trouvée dans tous les organes, au niveau des cellules endothéliales des vaisseaux sanguins issus de la vasculogénèse et de l'angiogénèse. Son expression diminue chez l'adulte mais reste détectable (Schnurch *et al.*, 1993; Dumont *et al.*, 1995). Ce gène est à nouveau fortement exprimé lors de la réactivation de l'angiogénèse au cours de la formation du placenta (Schnurch *et al.*, 1993), lors de cicatrisation ou lors de l'angiogénèse tumorale (Peters *et al.*, 1998). Le gène murin ne possède pas de boîte TATA mais une boîte CCAAT a été localisée en position -65 pb par rapport au site d'initiation de la transcription (Fadel *et al.*, 1998). Le fragment de gène [-200/+300] utilisé dans un vecteur rapporteur en transgénèse ne permet pas d'observer de coloration LacZ dans les embryons mais l'utilisation d'un fragment plus long qui s'étend sur 900 pb en amont du site d'initiation de la transcription permet d'obtenir une coloration spécifique dans les cellules endothéliales. L'expression est détectée dès 7,5 j dans le mésoderme extra-embryonnaire, puis à 8,5 j, les cellules endothéliales de l'aorte dorsale, des artères

intersomitiques, de l'endocarde et du sac vitellin, apparaissent marquées. À partir de 9,5 j, l'expression dirigée par le transgène diminue et ne se retrouve qu'au niveau de l'aorte dorsale, de certains arcs aortiques, et du sac aortique. Le marquage devient très hétérogène et ne concerne que quelques populations des cellules endothéliales de l'endocarde et des artères intersomitiques, alors que le foie apparaît très coloré. Après 12,5 j, le marquage ne se retrouve plus que dans le foie et plus aucune coloration n'est détectée chez l'adulte. Le placenta des souris transgéniques gestantes n'est pas coloré, ce qui est différent du profil d'expression du gène *Tie-2* endogène. Même l'utilisation d'une région promotrice beaucoup plus longue, qui s'étend à 7,2 kb en amont du site d'initiation, ne permet pas de restituer le profil endogène du gène. L'analyse *in vivo* du fragment de promoteur de la région [-1200/+300] a permis de mettre en évidence deux régions qui seraient importantes pour réguler l'expression du gène dans les cellules endothéliales. La première région, de 223 pb, est située en 5' du gène au niveau [-760/-537]. Le retrait de cette région affecte considérablement l'expression de LacZ, qui ne se retrouve plus que dans quelques cellules endothéliales de la veine cardinale et de l'aorte dorsale de l'embryon. La seconde région située dans le premier exon, de 250 pb, semble également fondamentale puisqu'aucune expression LacZ n'est détectée dans les embryons issus de la transgénèse en son absence (Schlaeger *et al.*, 1995). Cependant, tous ces fragments de promoteur ne permettent pas de restituer le profil d'expression complet du gène *Tie-2*. En utilisant les 1,8 kb de la région promotrice à laquelle sont ajoutés 10 kb de la portion 5' du premier intron dans le cadre d'un vecteur de transgénèse, l'analyse des embryons à 11,5 j montre une forte coloration β -galactosidase dans tous les vaisseaux sanguins, qui persiste au cours du développement et chez l'adulte dans les vaisseaux sanguins du cerveau et de nombreux organes comme le cœur, les reins, la rate entre autres. Cette séquence intronique contient donc une région de régulation qui permet d'obtenir une expression forte et uniforme du transgène. De plus, tous les embryons transgéniques obtenus sont colorés. L'ajout du premier intron permet donc de supprimer les variations de coloration dues au site d'intégration du transgène. Un fragment interne de 1,7 kb de cet intron active spécifiquement la transcription dans les cellules endothéliales mais pas dans les fibroblastes *in vitro*. L'essentiel de la fonction serait porté par un élément interne de 303 pb. Le fragment de 1,7 kb intronique et sa région interne de 303 pb sont capables d'activer *in vitro* de façon autonome la transcription dirigée par un promoteur minimal dans les cellules endothéliales. Cette fonction d'*enhancer* a été confirmée *in vivo* : les souris transgéniques issues de l'injection du fragment de 1,7 kb montrent un même profil d'expres-

sion, assez similaire à celui obtenu avec les 10 kb de séquence intronique, mais de façon un peu moins uniforme, avec, par exemple, une absence de marquage au niveau des glomérules du rein. (Schlaeger *et al.*, 1997). Le promoteur proximal comporte également une région U (-105/-96) et une région A (-76/-57) qui seraient des régions positives de régulation. Une analyse par empreinte à la DNase a mis en évidence une région B (-38/-20) où se formerait un complexe différent entre les cellules endothéliales et les cellules non-endothéliales (Fadel *et al.*, 1998). Les sites qui pouvaient être impliqués dans la régulation de cette région intronique ont été étudiés *in vivo* en analysant l'activité du transgène où les 1,7 kb ont été placés en amont d'un promoteur minimal dirigeant l'expression LacZ. La suppression d'un site EBS dans cet *enhancer* abolit complètement l'activité transactivatrice et de même pour un fragment qui comporte des sites de fixation pour les différents facteurs bZIP, CP2- γ et pour un membre de la famille ETS, le facteur PEA3 (Schlaeger *et al.*, 1997).

Le facteur NERF2, un membre de la famille ETS, serait impliqué dans le mécanisme de régulation de l'expression du gène dans les cellules endothéliales exercé par la région située dans le premier exon. Ce facteur est capable de transactiver cette région du promoteur et cette activation ne peut se faire sans la présence de cette région de régulation. L'analyse informatique de la séquence a permis d'identifier une région où se trouvent cinq sites EBS successifs. Deux de ces sites apparaissent fondamentaux pour la régulation : la mutation des deux sites EBS4 et EBS5 abolit la transactivation du fragment de promoteur [-900/+300] par le facteur NERF2 et diminue de 50 % l'activité de ce fragment de promoteur dans les cellules endothéliales alors que l'activité dans les cellules non-endothéliales n'est presque pas modifiée. La fixation de ce facteur sur la séquence de cette région dans les cellules endothéliales a été démontrée par gel retard et le site EBS4 montre la plus forte affinité pour le facteur NERF2. Cette régulation pourrait être un mécanisme conservé car la séquence qui contient les sites EBS existe également avec 100 % d'homologie sur le promoteur humain (Dube *et al.*, 1999).

Le gène *VE-cadhérine*

La VE-cadhérine est une protéine transmembranaire présente au niveau des jonctions adhérentes des cellules endothéliales. Cette molécule est notamment impliquée dans le contrôle de la perméabilité vasculaire (Gavard *et al.*, 2006), elle participe à l'inhibition de contact de la prolifération des cellules en situation de confluence (Caveda *et al.*, 1996) et par son interaction avec VEGFR-2, elle transmet un signal de survie cellulaire émis par le VEGF à l'intention des

cellules endothéliales (Carmeliet *et al.*, 1999). L'expression du gène *VE-cadhérine* est spécifiquement détectée dans les cellules endothéliales *in vitro* et *in vivo* (Breier *et al.*, 1996) ; elle est observée dès 7,5 j de développement embryonnaire dans les îlots sanguins primitifs du sac vitellin. Au cours du développement embryonnaire, le gène *VE-cadhérine* est exprimé dans les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins issus des processus de vasculogénèse et d'angiogénèse et son expression se retrouve au niveau de tous les organes de l'embryon. L'expression de la VE-cadhérine persiste chez l'adulte dans tous les vaisseaux sanguins, sauf au niveau des capillaires cérébraux où elle diminue. Son expression a également été décrite dans le trophoblaste (Breier *et al.*, 1996).

Un seul site d'initiation de la transcription a été localisé sur la séquence murine, il se situe au début du premier exon, à 75 pb en amont du site d'initiation de la traduction. Le promoteur est dépourvu de boîte TATA ou CAAT (Huber *et al.*, 1996). La séquence promotrice murine présente des îlots CpG au niveau des régions [-1012/-811] et [-1590/-1535] qui ne sont pas conservés dans les 3,5 kb de la séquence promotrice humaine (Prandini *et al.*, 2005). Trois régions de régulation ont été initialement identifiées : le promoteur proximal [-139/+24], qui permet une expression non spécifique des cellules endothéliales et des régions de régulation spécifique négatives [-289/-140] et [-2226/-1191] plus distales, qui interviennent dans l'expression spécifique du gène dans les cellules endothéliales en diminuant la transcription dans les cellules non-endothéliales (Gory *et al.*, 1999). L'analyse *in vivo* par transgénèse chez la souris confirme l'importance de ces régions. Le gène rapporteur CAT placé en aval du fragment [-2486/+24] du promoteur murin, qui contient l'ensemble des régions identifiées, s'exprime dans les cellules endothéliales de l'embryon dès 7,5 j de développement embryonnaire et son expression persiste dans les vaisseaux de l'adulte, à l'exception des capillaires cérébraux. La région [-2486/+24] du promoteur permet donc de restituer quasiment complètement le profil endogène du gène *VE-cadhérine* chez l'embryon et chez l'adulte, ce qui suggère que la majorité des régions impliquées dans la régulation spécifique de l'expression du gène dans les cellules endothéliales y sont présentes (Gory *et al.*, 1999). Un *enhancer* a également été identifié dans une région de 4 kb située dans la région 5' du premier intron, qui permet d'augmenter l'expression de cette région dans les cellules endothéliales *in vivo*. Les éléments de réponse présents dans cette région n'ont pas été identifiés (Hisatsune *et al.*, 2005).

La transcription basale au niveau du promoteur proximal dépend d'une séquence riche en GT située en [-49/-39] et de deux sites EBS, EBS2 [-93/-90] et EBS4 [-109/-106]. La mutation de chacun de ces sites

provoque une chute d'au moins 70 % de l'activité du promoteur proximal dans tous les types cellulaires. Le site riche en GT permet la fixation des facteurs de transcription Sp1 et Sp3 dans les cellules endothéliales et dans les cellules non-endothéliales. La présence simultanée sur le promoteur des facteurs Sp1, un facteur activateur et Sp3, un potentiel répresseur, pourrait intervenir dans le cadre d'une modulation de la transcription (Gory *et al.*, 1998). Parmi les facteurs ETS, Fli-1 ou Erg sont capables de se fixer sur le site EBS4 (Gory *et al.*, 1998) et Ets-1 peut se fixer sur les séquences des sites EBS2 et EBS4 et activer le gène (Lelièvre *et al.*, 2000). D'autre part, le facteur Erg est fixé sur le gène dans les cellules endothéliales, il est capable de l'activer et son inhibition entraîne une baisse d'expression de la VE-cadhérine (Birdsey *et al.*, 2008). Nous avons récemment montré que le promoteur proximal du gène de la *VE-cadhérine* était régulé en synergie par les facteurs de transcription Ets-1 et HIF-2 α , en absence de tout contexte hypoxique (Le Bras *et al.*, 2007).

La région 5' du gène humain a été isolée et le site d'initiation de la transcription identifié. L'analyse du fragment [-3499/-5] du promoteur humain a permis d'identifier différentes régions de régulation : le promoteur proximal [-166/-5] contient des éléments de régulation qui permettent l'expression spécifique d'un gène rapporteur dans les cellules endothéliales et la région [-1135/-744] serait un *enhancer* de la transcription dans ces cellules. Bien que ces régions ne correspondent pas à celles identifiées dans le promoteur murin, certains mécanismes de régulation pourraient être conservés car des homologies existent au niveau du promoteur proximal et dans la région [-929/-741] (Prandini *et al.*, 2005). L'activité d'un fragment de 3,5 kb de la région 5' du gène en amont du site d'initiation de la transcription, qui contient les régions identifiées *in vitro*, a été analysée *in vivo* par transgénèse chez la souris. Ce fragment, placé en amont du gène LacZ, dirige l'expression du rapporteur dès 7,5 j de développement embryonnaire dans les îlots sanguins du sac vitellin et à 12,5 j dans les cellules endothéliales des vaisseaux de tous les organes. Le modèle ne retranscrit pas complètement le profil du gène *VE-cadhérine* : l'expression persiste chez l'adulte dans de nombreux organes mais elle n'est pas détectée dans le thymus et dans le muscle squelettique. Ainsi, les régions de régulation présentes dans le fragment de 3,5 kb de promoteur sont suffisantes pour diriger l'expression dans les cellules endothéliales mais elles ne ciblent que les vaisseaux de certains tissus et l'expression du LacZ est également retrouvée dans des cellules non-endothéliales au niveau du système nerveux. Il est donc possible qu'il manque une séquence de régulation négative dans ce fragment, ou que des éléments de la régulation

nécessaires au fonctionnement du promoteur humain ne soient pas présents chez la souris (Prandini *et al.*, 2005). La régulation du promoteur proximal humain et souris pourrait être un mécanisme conservé car deux sites EBS et un site Sp1 correspondent aux sites fonctionnels qui ont été identifiés sur le promoteur murin. Ces sites sont occupés *in vitro* en présence d'extraits de cellules endothéliales (Prandini *et al.*, 2005).

Scl/Tal-1 joue un rôle fondamental pour l'expression du gène *VE-cadhérine* dans les cellules endothéliales, notamment en régulant la région activatrice [-1135/-744] qui a été identifiée *in vitro* (Deleuze *et al.*, 2007). L'implication de ce facteur dans la régulation de l'expression du gène *VE-cadhérine* a été suggérée par le fait que l'inhibition de son expression dans les cellules endothéliales provoque une diminution du taux de la protéine VE-cadhérine. (Deleuze *et al.*, 2007). Il existe deux régions conservées en [-150/-80] et en [-800/-770], qui correspondent à un site de fixation de Scl/Tal-1, une E-box, située à proximité d'un site de fixation des facteurs GATA. Cette combinaison de sites est celle qui est communément retrouvée au niveau des promoteurs de gènes hématopoïétiques régulés par Scl/Tal-1. Les sites E-box en position -784 et GATA en position -798 sont impliqués dans l'expression spécifique du gène dans les cellules endothéliales, leur mutation diminuant de près de 70 % l'activation du fragment de promoteur [-1135/-5] dans les cellules endothéliales, alors que l'activité dans les cellules non-endothéliales n'est pas modifiée. Le mécanisme de régulation au niveau de ces sites implique l'interaction de Scl/Tal-1 avec le facteur GATA fixé à proximité et Scl/Tal-1 recrute les partenaires protéiques E47 et Lmo2 activant ainsi la transcription. L'utilisation de mutants des différents domaines de Scl/Tal-1 a montré que sa liaison à l'ADN et son association avec ces deux partenaires étaient nécessaires à l'activation transcriptionnelle du gène. Le facteur Scl/Tal-1 interagirait au niveau du site [-800/-770] avec les différents partenaires protéiques E47, Lmo2, GATA2 et Ldb1 dans le cadre d'un complexe multiprotéique pour activer spécifiquement la transcription du gène *VE-cadhérine* dans les cellules endothéliales (Deleuze *et al.*, 2007). La régulation du gène *VE-cadhérine* est donc un exemple de la conservation des mécanismes de régulation communs entre les lignées endothéliale et hématopoïétique.

La régulation épigénétique de l'expression des gènes endothéliaux

Le gène *eNOS*

Les cellules endothéliales expriment constamment un niveau basal d'eNOS; son expression est ainsi qua-

lifiée de constitutive, comme celle de la nNOS ('*Neuronal nitric-oxide-synthase*') au niveau des neurones, par opposition avec la iNOS ('*Inductible nitric-oxide-synthase*') décrite au niveau des macrophages et dont l'expression est consécutive à un stimulus (Sessa 1994). L'expression de l'eNOS est presque exclusivement restreinte à l'endothélium (Wilcox *et al.*, 1997) mais peut aussi se retrouver au niveau de quelques autres types cellulaires comme les cellules du syncytiotrophoblaste (Conrad *et al.*, 1993), les cellules pyramidales du cerveau ou au niveau des myocytes cardiaques (Wei *et al.*, 1996). L'expression d'eNOS est relativement tardive dans l'endothélium puisqu'elle n'est détectée qu'à partir de 9,5 jours de développement embryonnaire. Son expression se poursuit chez l'adulte où les ARNm sont essentiellement détectés au niveau des cellules endothéliales qui bordent la lumière des artères de moyenne et de grande taille (Wilcox *et al.*, 1997). Le promoteur du gène *eNOS* a été isolé dans de nombreuses espèces : humaine (Marsden *et al.*, 1993), murine (Gnanapandithen *et al.*, 1996) porcine (Zhang *et al.*, 1997), et bovine (Venema *et al.*, 1994). Les promoteurs humain, murin et bovin présentent un fort pourcentage d'homologie, ce qui pourrait indiquer que les mécanismes de régulation sont conservés entre les espèces (Teichert *et al.*, 1998). Le site d'initiation de la transcription a été localisé à 22 pb en amont du site d'initiation de la traduction et ne correspond pas à une boîte TATA (Marsden *et al.*, 1993). L'analyse *in vitro* de l'activité transcriptionnelle dans les cellules endothéliales par découpage progressif en 5' de la région promotrice humaine et par la technique de mutagenèse appelée « *linker-scanning* » a permis de localiser deux régions au niveau du promoteur proximal impliquées dans une régulation positive du gène (PRD : '*positive regulatory domain*') : PRDI entre -104/-95 par rapport au site initial de la transcription et PRDII entre -144/-115 (Karantzoulis-Fegaras *et al.*, 1999). L'insertion des 1,6 kb de promoteur humain dans un vecteur de transgénèse chez la souris dirige l'expression de LacZ dans les cellules endothéliales, mais seulement dans celles du cœur, des muscles squelettiques du cerveau et de l'aorte (Guillot *et al.*, 1999). Ce fragment de promoteur est donc insuffisant pour restituer le profil d'expression endogène complet de l'eNOS. En revanche, l'utilisation des 5,2 kb de promoteur murin en amont du site initial de la transcription dans un vecteur de transgénèse (Teichert *et al.*, 2000) dirige l'expression de LacZ dans l'ensemble des cellules endothéliales où s'exprime la eNOS. Ce fragment murin de 5,2 kb contient en effet des séquences homologues à celles de l'*enhancer* identifié par un traitement à la DNase 1 du promoteur humain. Un site hypersensible (HS1) a été détecté à 4,9 kb en amont du site initial de la transcription dans les cellules endothéliales mais pas dans les cellules non-endothéliales. Cette région

de 269 pb se comporte comme un *enhancer*. Les facteurs Sp1 et Sp3 se fixent sur le domaine PRDI. Le domaine PRDII fixe ces mêmes facteurs mais avec une affinité moindre. Il serait surtout le siège de la fixation d'un des membres de la famille ETS, le facteur Elf-1. Ets-1, Sp1 et Sp3 coopèreraient de façon positive sur ce promoteur. D'autres facteurs se fixent sur le domaine PRDII, tels YY1 ou MAZ. La fixation du facteur Sp1 et des facteurs MAZ et YY1 pourrait permettre à l'ADN d'adopter une courbure spéciale facilitant la fixation du facteur Elf-1, qui activerait alors la transcription du gène (Karantzoulis-Fegaras *et al.*, 1999). La régulation de l'*enhancer* impliquerait des facteurs de la famille MZF qui se fixeraient au niveau de deux demi-sites et des membres de la famille ETS, le facteur Erg étant peut-être impliqué.

Les différences de résultats obtenus lors de l'analyse *in vitro* et *in vivo* du promoteur d'*eNOS* laissent suggérer que la structure chromatiniennne pouvait intervenir dans la régulation du gène. En effet, la transfection *in vitro* du promoteur permet d'obtenir un fort taux d'activation dans différentes lignées cellulaires, dont des cellules non-endothéliales, alors que l'utilisation des mêmes séquences dans le cadre d'un vecteur de transgénèse permet d'obtenir une expression spécifiquement endothéliale.

Implication de phénomènes épigénétiques dans la régulation du gène

L'*eNOS* présente une région méthylée de façon différentielle au niveau de son promoteur proximal, les cellules non-endothéliales étant plus fortement méthylées au niveau de cette région (Chan *et al.*, 2004). Les cellules endothéliales sont enrichies en histone H3 acétylées sur la lysine 9, et en histone H4 acétylée sur la lysine 12, au niveau du promoteur proximal et de la région codante qui jouxte le site d'initiation de la transcription (Fish *et al.*, 2005). L'acétylation des histones précède la méthylation de la lysine 4 de l'histone H3. Au niveau du promoteur proximal de l'*eNOS*, il y aurait recrutement des HDAC, notamment la HDAC1, dans les cellules non-endothéliales par deux voies distinctes : la méthylation de l'ADN au niveau du DMR permettrait le recrutement des HDAC *via* des facteurs comme MeCP2. Les HDAC pourraient également être recrutées par l'intermédiaire de facteurs *trans*, comme c'est le cas au niveau du gène du facteur de von Willebrand (*vWF*) où l'on observe un recrutement différentiel des HDAC-1 et 2 par NF-Y dans les cellules non-endothéliales. L'expression spécifique du gène *eNOS* pourrait également impliquer des mécanismes post-traductionnels avec l'existence d'un ARNm antisens (*sONE*) qui présente 662 nucléotides communs avec l'ARNm *eNOS* chez l'homme. L'expression de *sONE* est retrouvée dans de

nombreux types cellulaires mais pas au niveau des cellules endothéliales (Robb *et al.*, 2004).

Le gène *Notch-4*

Le gène *Notch-4* est spécifiquement exprimé dans cellules endothéliales. Son expression a été détectée dès 7,5 j de développement et son profil d'expression embryonnaire est le même que celui du gène *Flk-1* (Shirayoshi *et al.*, 1997). Le promoteur humain a été étudié. La comparaison des séquences humaines et murines du gène *Notch-4* a permis de montrer que les exons étaient fortement conservés, de même que le promoteur proximal et le premier intron. En revanche, la région 5' du gène ne présente qu'une seule région homologue entre les deux espèces, située environ à 4 kb en amont du site d'initiation de la transcription (N4-1). *In vitro*, une région minimale de 650 pb, qui correspond au promoteur proximal, est suffisante pour permettre une expression dix fois plus importante du gène rapporteur dans les cellules endothéliales que dans les cellules non-endothéliales. L'ajout des 800 pb du premier intron permet d'augmenter légèrement la transcription dirigée par ce promoteur proximal, indépendamment du type cellulaire. De même, l'ajout des 4 kb de séquence en amont du promoteur proximal ou uniquement de sa région conservée interne ne modifie que légèrement l'activité. L'analyse *in vivo* montre que l'utilisation du promoteur proximal seul dans un vecteur de transgénèse n'est pas suffisante pour observer une expression du gène rapporteur dans l'embryon. L'ajout du premier intron dans ce transgène permet d'activer fortement l'expression du gène rapporteur dans les cellules endothéliales de l'embryon. La région 5' de 4 kb permet également d'activer l'expression du gène LacZ sous le contrôle du promoteur proximal. Cette construction est celle qui permet d'obtenir le profil d'expression dans les cellules endothéliales le plus proche du profil endogène. Le premier intron et la région 5' de 4 kb agissent donc comme des *enhancers* de la transcription *in vivo* (Wu *et al.*, 2005).

L'activité spécifique du promoteur proximal dans les cellules endothéliales est régulée par un site de fixation du facteur AP1 conservé entre les espèces murine et humaine et la mutation de ce site AP1 abolit presque totalement l'expression du gène LacZ *in vivo*.

In vitro ce site est occupé dans les deux types cellulaires mais la taille des complexes formés diffère en fonction du type cellulaire. Ceci est dû au recrutement différent des sous-unités qui composent les complexes AP1 en fonction de la lignée. La différence de composition des complexes est liée au taux différent d'expression de ces protéines dans les deux types cellulaires. Les cellules endothéliales expriment préférentiellement

les sous-unités Fra-1 et c-jun alors que les cellules HeLa expriment préférentiellement JunB. L'expression du gène *Notch-4* dans les cellules endothéliales est donc contrôlée par la formation d'un complexe AP1 spécifique. Mais l'utilisation de sites AP1 synthétiques dans un vecteur rapporteur montre que les différents complexes AP1 des HeLa et des HUVEC ont les mêmes capacités d'activation. Ceci suggère donc que la composition du complexe AP1 ne suffit pas pour expliquer la spécificité de régulation observée au niveau de ce site. Dans les cellules endothéliales, il y aurait donc un recrutement préférentiel du complexe AP1, qui nécessiterait l'intervention d'un cofacteur ou qui pourrait provenir d'une accessibilité différente de ce complexe à la séquence promotrice, ce qui s'expliquerait par la structure chromatiniennne différente de cette région en fonction du type cellulaire (Wu *et al.*, 2005).

L'analyse du profil de modification des histones H3 et H4 par ChIP de la séquence du gène s'étendant sur 4 kb en amont du site d'initiation de la transcription jusqu'à la fin de la séquence codante a permis de montrer que le promoteur proximal, le premier intron et le troisième exon étaient enrichis en histones H3 et H4 présentant une acétylation de leurs résidus lysines et en histone H3 méthylée sur la lysine 4 dans les cellules endothéliales. Aucun enrichissement pour ces modifications n'a pu être identifié le long de la séquence du gène dans les HeLa, sauf au niveau de l'exon 30 où une augmentation de la méthylation de la lysine 4 de H3 a pu être constatée dans les deux lignées. Cette région correspond en fait au début de la région promotrice du gène G18 situé en 3' du locus du gène *Notch-4*. L'analyse de la présence de PolII sur la séquence du gène a également permis de montrer un recrutement préférentiel de cette enzyme dans la région du promoteur proximal et que ce recrutement était spécifique des cellules endothéliales. En revanche, la région N4-1, qui correspond à la séquence conservée située 4 kb en amont du site d'initiation de la transcription, ne présente pas d'enrichissement particulier pour ces modifications dans les cellules endothéliales. Les résultats de l'analyse *in vivo* et du profil de modification des histones suggèrent un modèle de collaboration entre les différentes régions identifiées, où la région 5' de 4 kb et la région du premier intron sont nécessaires pour permettre au promoteur proximal d'exercer sa régulation spécifiquement endothéliale par le complexe AP1. En effet, *in vivo* ces régions sont importantes pour permettre l'expression dans les cellules endothéliales, mais *in vitro*, aucune activité activatrice ne leur a été attribuée. Dans les cellules endothéliales, ces régions pourraient recruter les enzymes de modification des histones qui permettent d'augmenter l'accessibilité du complexe AP1 à la chromatine du promoteur proximal (Wu *et al.*, 2005).

Le gène du récepteur à la protéine C

L'expression de ce gène est détectée dans les cellules endothéliales de l'embryon à partir de 11,5 jours. Son expression persiste chez l'adulte, surtout au niveau des gros vaisseaux. Ce gène est également exprimé dans les cellules souches hématopoïétiques. Deux sites d'initiation majeurs de la transcription ont été localisés aux positions -79 et -82 par rapport au site d'initiation de la traduction dans le gène humain.

La localisation *in vivo* des régions potentiellement impliquées dans la régulation du gène a été réalisée par un traitement à la DNase de la séquence du gène s'étendant sur 20 kb en amont du site d'initiation de la traduction en 5' et sur 18,2 kb en 3', dans des cellules endothéliales et dans des cellules non-endothéliales. Un site situé 2,9 kb en 3' du site d'initiation de la traduction (+2,9 HS) est ainsi hypersensible préférentiellement dans les cellules non-endothéliales, une région située à -5,5 kb (-5,5 HS) est uniquement sensible dans les cellules endothéliales et dans les cellules immatures hématopoïétiques. Enfin la région qui correspond au promoteur proximal est hypersensible dans les deux types cellulaires (Mollica *et al.*, 2006). L'utilisation d'un fragment de promoteur qui contient le promoteur proximal [-2336/-9] permet une expression spécifique d'un gène rapporteur dans les cellules endothéliales *in vitro* mais ne permet pas de cibler l'expression du gène LacZ *in vivo* dans les cellules endothéliales, suggérant qu'il existe d'autres régions de régulation nécessaires. La région -5,5 HS est contenue dans une séquence conservée de 130 pb [-5657/-5527] qui présente 75 % d'homologie avec une région située à 8,3 kb en amont du site d'initiation de la traduction avec la séquence murine. L'utilisation de 6 kb de séquence comportant la région -5,5 HS placés en amont du promoteur proximal dans un transgène permet d'obtenir une expression spécifique dans les cellules endothéliales de l'embryon avec un marquage fort au niveau des gros vaisseaux comme l'aorte et la veine cave. L'expression LacZ persiste chez l'adulte comme c'est le cas pour le gène endogène. *In vitro*, la région -5,5 HS montre une activité *enhancer* non spécifique, l'augmentation transcriptionnelle étant observée dans les cellules endothéliales et dans les cellules non-endothéliales. Les résultats sont différents *in vivo* où l'utilisation de cette région -5,5 HS en amont d'un promoteur minimal permet une coloration spécifique des cellules endothéliales de l'embryon. La région -5,5 HS du promoteur du gène du récepteur à la protéine agit donc comme un *enhancer* endothélial autonome.

L'analyse du profil de modification des histones montre que les cellules endothéliales ont un taux d'enrichissement 7 fois supérieur au niveau de la région par rapport aux cellules non-endothéliales. Une analyse

d'empreinte *in vivo* a permis d'identifier des sites spécifiquement occupés dans les cellules endothéliales au niveau de cette région. Ils correspondent à des sites potentiels de fixation pour les facteurs ETS, GATA et Scl/Tal-1 et sont conservés sur la séquence murine. La mutation de chacun de ces sites diminue fortement l'activité 'enhancer' du fragment de la région -5,5 HS. Des expériences de CHIP ont permis de montrer la fixation de facteurs comme Fli-1, GATA-2 et la fixation de Scl/Tal-1 sur la séquence murine de 8,3 kb homologue avec des membres de la famille ETS et GATA-2 a été démontrée. Les facteurs Scl/Tal-1 et GATA-2 peuvent s'assembler dans un complexe de régulation GATA/Ldb1/Lmo2/Scl/Tal-1 qui a été décrit sur le promoteur de la VE-cadhérine et qui pourrait intervenir aussi sur l'enhancer du gène du récepteur de la protéine C.

Le gène *vWF*

L'expression du gène *vWF* est restreinte à quelques types cellulaires : les cellules endothéliales, les plaquettes et les mégacaryocytes (Piovella *et al.*, 1978). Au cours du développement embryonnaire, l'expression de *vWF* ne se retrouve qu'au niveau de certaines populations de cellules endothéliales (Coffin *et al.*, 1991) et cette hétérogénéité d'expression se retrouve chez l'adulte, où le taux d'ARNm de ce gène varie en fonction de la nature et de la localisation de l'endothélium. L'expression de *vWF* est généralement plus importante dans les veines que dans les artères, et plus abondante dans certains organes, comme le poumon et le cerveau, que dans le rein et le foie (Smith *et al.*, 1996). Le promoteur humain du gène *vWF* comporte un site d'initiation de la transcription situé à 250 pb en amont du site d'initiation de la traduction, localisé au niveau du second exon (Bonthron *et al.*, 1988). Une situation similaire existe chez la souris, une boîte TATA située à 30 pb en amont du site d'initiation de la transcription étant également conservée entre ces deux espèces (Guan *et al.*, 1999). Sur la séquence humaine, une boîte CAAT a également été localisée, 8 pb en 3' de la boîte TATA, donc très proche du site d'initiation de la transcription, une situation assez atypique. Une analyse de la région promotrice humaine par découpage des régions 3' et des 12 kb en amont du site d'initiation de la transcription a montré que le fragment [-487/+247] dirige l'expression d'un gène rapporteur spécifiquement dans les cellules endothéliales et pas dans les HeLa ou dans les cellules musculaires lisses. Ce fragment est constitué d'un promoteur minimal [-90/+22], d'un élément de régulation négatif dans la région [-500/-300], qui inhibe l'activité dans tous les types cellulaires, et d'une région de régulation positive spécifique des cellules endothéliales située dans le premier exon (Jahroudi

& Lynch, 1994). La région de régulation positive du premier exon inhibe la répression de la transcription opérée par la région négative uniquement dans les cellules endothéliales. Le fonctionnement de cette région implique un site de fixation pour les membres de la famille GATA localisé en +222 car la mutation de ce site provoque une chute de l'activité transactivatrice portée par le fragment [-487/+247] dans les cellules endothéliales (Jahroudi *et al.*, 1994). Ce site pourrait intervenir dans le cadre d'un mécanisme conservé entre les espèces puisqu'il est présent sur la séquence murine (Guan *et al.*, 1999). Le facteur GATA-6 se fixe au niveau de ce site dans les cellules endothéliales et dans les cellules non-endothéliales (Peng *et al.*, 2003) et il ne peut donc pas expliquer seul la spécificité endothéliale, à moins d'une interaction avec des cofacteurs spécifiques. Un autre élément situé dans la région [+164/+169] semble intervenir dans la régulation positive de cette région. Il correspond à la séquence ATGGCC qui est conservée dans les espèces humaine, murine et bovine. Les expériences de retard sur gel au niveau de ce site montrent la fixation spécifiquement endothéliale d'une protéine apparentée à l'histone H1 de 32 kDa. Le rôle de ce site serait très important dans la régulation endothéliale de l'expression car sa mutation diminue de 50 % l'activité du promoteur [-487/+247] dans les cellules endothéliales (Wang *et al.*, 2004). Une autre région de régulation positive a été identifiée dans le promoteur minimal du gène *vWF* humain. Le fragment [-60/+19] est porteur d'une régulation spécifique qui active la transcription uniquement dans les cellules endothéliales. Cette région comporte deux sites TTTCCCTTT en [-56/-49] et en [-43/-36] qui contiennent la séquence consensus d'un EBS. Ces deux sites sont conservés dans la séquence bovine (Janel *et al.*, 1995). Le site EBS est fondamental puisque sa mutation abolit la transcription dirigée par le promoteur minimal dans les cellules endothéliales. La protéine recombinante Ets-1 est capable de se fixer sur ce site et un autre membre de la famille ETS, le facteur Erg est également un candidat qui ne se fixerait au niveau de ce site que dans les cellules endothéliales. La co-transfection dans les cellules HeLa du promoteur minimal [-60/+19] avec les vecteurs d'expression des facteurs Ets-1 ou Erg, induit une transactivation de la transcription qui est abolie quand le site EBS situé le plus en 5' est muté (Schwachtgen *et al.*, 1997). Ainsi, l'analyse *in vitro* a permis d'identifier deux régions importantes pour l'expression spécifique du gène *vWF* dans les cellules endothéliales et il est possible que cette région d'activation endothéliale du promoteur minimal interagisse avec la région de régulation positive située au niveau du premier exon. Ces deux régions sont contenues dans la séquence qui s'étend de -140 pb en 5' jusqu'à la fin du premier exon et qui est conservée à 70 % entre les

espèces murines et humaines, ce qui suggère leur implication dans une régulation conservée (Guan *et al.*, 1999).

L'expression spécifique d'un gène dans les cellules endothéliales peut être due à la présence de séquences régulatrices sur le promoteur qui ne favorisent la transcription que dans ce type cellulaire ou à l'existence de régions inhibitrices de l'expression dans les cellules non-endothéliales. La région de régulation présente dans le premier exon du gène *vWF* posséderait les deux types de mécanismes. L'analyse *in vitro* du promoteur humain a en effet permis d'identifier des régions de régulation négatives. La fixation du facteur Oct1 sur une séquence octamère-like en [-133/-125] dans les cellules endothéliales et les HeLa, serait ainsi responsable d'une diminution de l'activité du promoteur (Schwachtgen *et al.*, 1998). Un facteur NF1-like se fixe en [-470/-440] et réprime la transcription du gène dans les cellules endothéliales et dans les cellules musculaires lisses. La mutation de ce site augmente la transcription du fragment [-487/+155] dans les deux types cellulaires (Jahroudi *et al.*, 1996). Nous avons vu que des éléments de régulation positifs potentiels y ont été identifiés ; le facteur GATA-6 et une forme variante de l'histone H1. Mais un élément de régulation négative pour les cellules non-endothéliales serait également présent dans cette région, au niveau de la séquence [+155/+244] du promoteur de *vWF*. En effet, le fragment [-90/+155] du promoteur est actif dans les cellules endothéliales et dans les cellules non-endothéliales alors que le fragment [-90/+244] n'active plus la transcription que dans les cellules endothéliales. Cette régulation négative impliquerait le facteur de transcription NF-Y qui interagit avec une séquence située en [+226/+234], qui ne correspond pas à sa séquence consensus de reconnaissance CAAT. Sa fixation n'est pas spécifique des cellules non-endothéliales, elle est observée dans les HeLa, dans les cellules musculaires lisses mais aussi dans les cellules endothéliales. La mutation de ce site dans le fragment [-90/+247] permet d'activer spécifiquement la transcription du gène dans les cellules HEK 293 alors que le taux d'activation n'est pas modifié dans les cellules endothéliales. Ce facteur NF-Y présente une dualité de fonction au niveau du promoteur de *vWF* : il peut agir comme un activateur ou un répresseur. En effet, il se fixe également sur la boîte CAAT au niveau du promoteur minimal et cette fixation est nécessaire à l'activation du promoteur dans les cellules endothéliales. La composition des complexes NF-Y qui se fixent sur ces deux régions est la même, les sous-unités A et B ayant été localisées au niveau de ces deux sites. La fixation du complexe sur la boîte CAAT est plus stable que sur cette région négative, mais il est probable que la différence de fonction de ce complexe dépende surtout du re-

crutement de cofacteurs différents au niveau de ces deux sites (Peng & Jahroudi, 2002). Le facteur NF-Y se fixe dans les cellules endothéliales et dans les cellules non-endothéliales. La régulation négative dans les cellules non-endothéliales nécessite donc l'implication d'autres mécanismes. L'hypothèse d'un recrutement différentiel des complexes de modification des histones par ce facteur NF-Y en fonction du type cellulaire a alors été étudiée.

La régulation négative opérée par le premier exon implique des mécanismes épigénétiques. L'analyse du profil d'acétylation des lysines de l'histone H4 dans les HUVEC et dans les HEK 293 sur la région (-30/+155) montre un enrichissement dans les cellules endothéliales pour cette modification. Les deux types cellulaires ont en revanche le même profil d'acétylation pour l'histone H3. Il existe également un recrutement spécifique des HDAC-1 et -2 au niveau des cellules non-endothéliales, deux HDAC exprimées constitutivement par ces deux types cellulaires. Le site NF-Y situé au niveau du premier exon pourrait être impliqué dans l'acétylation différentielle des histones au niveau du promoteur car sa mutation ou sa délétion provoque une augmentation de l'acétylation de l'histone H4 et abolit le recrutement des HDAC dans les cellules non-endothéliales. Les sites de fixation pour GATA-6 et NF-Y sont très rapprochés, mais il semblerait que ces deux facteurs ne s'associent que dans les cellules non-endothéliales. Les auteurs proposent donc un modèle où GATA-6 en (+222) est associé à NF-Y de façon spécifique dans les cellules non-endothéliales. Le facteur NF-Y recruterait alors les HDAC au niveau du promoteur de *vWF* des cellules non-endothéliales, ce qui induirait une déacétylation de GATA-6 et des histones et une inactivation de la transcription. Dans les cellules endothéliales, un mécanisme spécifique empêcherait l'interaction entre les HDAC, NF-Y et GATA-6, comme par exemple une modification post-traductionnelle de GATA-6 (Peng & Jahroudi, 2003). Des mécanismes épigénétiques pourraient également participer à la régulation positive de la région. Dans les cellules endothéliales, le facteur NF-Y pourrait par exemple s'associer spécifiquement à une HAT, qui modifierait l'état de la chromatine et faciliterait la transcription.

Analyse *in vivo* du promoteur *vWF*

L'analyse *in vivo* du promoteur humain a été réalisée par transgénèse chez la souris. Le fragment (-487/+246) qui contient les régions de régulation identifiées, notamment le premier exon, a été placé en amont du gène *LacZ* et permet de diriger son expression dans certaines cellules endothéliales du sac vitellin et du cerveau chez l'adulte. Ce fragment ne contient pas toutes les informations nécessaires pour

restreindre l'expression spécifique du gène dans les cellules endothéliales puisque l'expression du gène rapporteur se retrouve dans des cellules non-endothéliales du cerveau (Aird *et al.*, 1995). Un autre fragment qui contient 2,2 kb de la région 5', le premier exon et le premier intron a également été étudié en transgénèse. En plus de l'expression dans les cellules endothéliales du cerveau, ce fragment permet une expression dans les petits vaisseaux des muscles squelettiques et du cœur (Aird *et al.*, 1997). L'analyse du promoteur murin donne pratiquement les mêmes résultats que le promoteur humain dans un modèle de souris transgéniques où 2,6 kb de la région 5' du gène *vWF* ainsi que le premier exon et le premier intron ont été introduits en amont du gène rapporteur LacZ. L'expression du rapporteur chez l'adulte n'est détectée que dans certaines cellules endothéliales : au niveau des petits et des moyens vaisseaux du cerveau, des capillaires du myocarde, du muscle squelettique mais également ici au niveau de l'aorte (Guan *et al.*, 1999). Ainsi, les régions promotrices utilisées lors des expériences de transgénèse ne dirigent l'expression du LacZ que dans certaines populations de cellules endothéliales. Une région promotrice donnée pourrait donc conditionner l'expression dans un type donné d'endothélium. Les mécanismes activés au niveau des régions promotrices dépendraient de la nature de la cellule endothéliale et de son environnement. Dans une seule des lignées transgéniques, l'expression est également détectée dans les mégacaryocytes de la moelle osseuse. Le mécanisme de régulation de l'expression dans cette lignée cellulaire pourrait donc être dépendant d'un environnement chromatinien favorable (Guan *et al.*, 1999).

L'analyse *in vitro* du promoteur murin du gène *vWF* confirme que des régions promotrices peuvent réguler la transcription différemment en fonction de la nature de la cellule endothéliale : ainsi le premier intron augmente la transcription dans les cellules non-endothéliales comme les HEK293 ou les 3T3, dans certaines cellules à caractère endothélial Py-4-1, mais pas dans les BAEC (Guan *et al.*, 1999).

L'analyse de la régulation de l'expression du gène *vWF* est intéressante car elle a permis d'identifier différents mécanismes dont la combinaison serait à l'origine de la spécificité endothéliale. Le promoteur de ce gène contient deux régions de régulation positive de l'expression du gène dans les cellules endothéliales, impliquant probablement des membres de la famille ETS dans le promoteur minimal et les protéines H1a et GATA-6 au niveau du premier exon. Mais la régulation de la région située dans le premier exon serait plus complexe et combinerait en fait des mécanismes de régulation, positive dans les cellules endothéliales et négative dans les cellules non-endothéliales, qui agirait en modifiant la structure

de la chromatine de façon différentielle dans ces deux types cellulaires. L'analyse du promoteur a également montré une régionalisation de la régulation le long du gène. Ainsi, une même région promotrice peut donc réguler différemment la transcription dans les cellules endothéliales et dans les cellules non-endothéliales ou différemment entre deux cellules endothéliales en fonction de leur nature.

Vu la diversité des mécanismes qui participent à l'expression spécifique des gènes dans les cellules endothéliales, il n'est pas possible de proposer un mécanisme commun de régulation de l'expression des gènes dans ces cellules. Les gènes endothéliaux sont régulés par des facteurs de transcription dont l'expression n'est pas restreinte à ce type cellulaire, certains étant même ubiquitaires. L'expression spécifique des gènes dans les cellules endothéliales est donc probablement déterminée par l'association spécifique de plusieurs de ces facteurs sur les régions de régulation et par une régulation épigénétique propre. Il est toutefois à noter que, dans tous les cas étudiés, des sites de fixation des membres de la famille des facteurs ETS importants pour la régulation d'expression spécifique dans ces cellules ont été identifiés, ce qui suggère que cette famille de gènes participe à l'identité de la cellule endothéliale.

Références

- Aird W.C., Edelberg J.M., Weiler-Guettler H., Simmons W.W., Smith T.W., Rosenberg R.D., Vascular bed-specific expression of an endothelial cell gene is programmed by the tissue microenvironment. *J Cell Biol*, 1997, 138, 1117–1124.
- Aird W.C., Jahroudi N., Weiler-Guettler H., Rayburn H.B., Rosenberg R.D., Human von Willebrand factor gene sequences target expression to a subpopulation of endothelial cells in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995, 92, 4567–4571.
- Akuzawa N., Kurabayashi M., Ohyama Y., Arai M., Nagai R., Zinc finger transcription factor Egr-1 activates Flt-1 gene expression in THP-1 cells on induction for macrophage differentiation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000, 20, 377–384.
- Birdsey G.M., Dryden N.H., Amsellem V., Gebhardt F., Sahnun K., Haskard D.O., Dejana E., Mason J.C., Randi A.M., The transcription factor Erg regulates angiogenesis and endothelial apoptosis through VE-cadherin. *Blood*, 2008, 111, 3498–3506.
- Bonthron D., Orkin S.H., The human von Willebrand factor gene. Structure of the 5' region. *Eur J Biochem*, 1988, 171, 51–57.
- Breier G., Breviario F., Caveda L., Berthier R., Schnürch H., Gotsch U., Vestweber D., Risau W., Dejana E., Molecular cloning and expression of murine vascular endothelial-cadherin in early stage development of cardiovascular system. *Blood*, 1996, 87, 630–641.

- Carlson T.R., Yan Y., Wu X., Lam M.T., Tang G.L., Beverly L.J., Messina L.M., Capobianco A.J., Werb Z., Wang R., Endothelial expression of constitutively active Notch4 elicits reversible arteriovenous malformations in adult mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102, 9884–9889.
- Carmeliet P., Lampugnani M.G., Moons L., Breviario F., Compernelle V., Bono F., Balconi G., Spagnuolo R., Oostuyse B., Dewerchin M., Zanetti A., Angellilo A., Mattot V., Nuyens D., Lutgens E., Clotman F., de Ruiter M.C., Gittenberger-de Groot A., Poelmann R., Lupu F., Herbert J.M., Collen D., Dejana E., Targeted deficiency or cytosolic truncation of the VE-cadherin gene in mice impairs VEGF-mediated endothelial survival and angiogenesis. *Cell*, 1999, 98, 147–157.
- Caveda L., Martin-Padura I., Navarro P., Breviario F., Corada M., Gulino D., Lampugnani M.G., Dejana E., Inhibition of cultured cell growth by vascular endothelial cadherin (cadherin-5/VE-cadherin). *J Clin Invest*, 1996, 98, 886–893.
- Chan Y., Fish J.E., D'Abreo C., Lin S., Robb G.B., Teichert A.M., Karantzoulis-Fegaras F., Keightley A., Steer B.M., Marsden P.A., The cell-specific expression of endothelial nitric-oxide synthase : a role for DNA methylation. *J Biol Chem*, 2004, 279, 35087–35100.
- Choi J., Dong L., Ahn J., Dao D., Hammerschmidt M., Chen J.N., FoxH1 negatively modulates flk1 gene expression and vascular formation in zebrafish. *Dev Biol*, 2007, 304, 735–744.
- Coffin J.D., Harrison J., Schwartz S., Heimark R., Angioblast differentiation and morphogenesis of the vascular endothelium in the mouse embryo. *Dev Biol*, 1991, 148, 51–62.
- Conrad K.P., Vill M., McGuire P.G., Dail W.G., Davis A.K., Expression of nitric oxide synthase by syncytiotrophoblast in human placental villi. *Faseb J*, 1993, 7, 1269–1276.
- Cowan P.J., Tsang D., Pedic C.M., Abbott L.R., Shinkel T.A., d'Apice A.J., Pearse M.J., The human ICAM-2 promoter is endothelial cell-specific *in vitro* and *in vivo* and contains critical Sp1 and GATA binding sites. *J Biol Chem*, 1998, 273, 11737–11744.
- Deleuze V., Chalhoub E., El-Hajj R., Dohet C., Le Clech M., Couraud P.O., Huber P., Mathieu D., TAL-1/SCL and its partners E47 and LMO2 up-regulate VE-cadherin expression in endothelial cells. *Mol Cell Biol*, 2007, 27, 2687–2697.
- Dorfman D.M., Wilson D.B., Bruns G.A., Orkin S.H., Human transcription factor GATA-2. Evidence for regulation of preproendothelin-1 gene expression in endothelial cells. *J Biol Chem*, 1992, 267, 1279–1285.
- Duarte A., Hirashima M., Benedito R., Trindade A., Diniz P., Bekman E., Costa L., Henrique D., Rossant J., Dosage-sensitive requirement for mouse D114 in artery development. *Genes Dev* 2004, 18, 2474–2478.
- Dube A., Akbarali Y., Sato T.N., Libermann T.A., Oettgen P., Role of the Ets transcription factors in the regulation of the vascular-specific Tie2 gene. *Circ Res*, 1999, 84, 1177–1185.
- Dumont D.J., Fong G.H., Puri M.C., Gradwohl G., Alitalo K., Breitman M.L., Vascularization of the mouse embryo : a study of flk-1, tek, tie, and vascular endothelial growth factor expression during development. *Dev Dyn*, 1995, 203, 80–92.
- Dutta D., Ray S., Vivian J.L., Paul S., Activation of the VEGFR1 chromatin domain : an angiogenic signal-ETS1/HIF-2alpha regulatory axis. *J Biol Chem*, 2008, 283, 25404–25413.
- Elvert G., Kappel A., Heidenreich R., Englmeier U., Lanz S., Acker T., Rauter M., Plate K., Sieweke M., Breier G., Flamme I., Cooperative interaction of hypoxia-inducible factor-2alpha (HIF-2alpha) and Ets-1 in the transcriptional activation of vascular endothelial growth factor receptor-2 (Flk-1). *J Biol Chem*, 2003, 278, 7520–7530.
- Fadel B.M., Boutet S.C., Quertermous T., Functional analysis of the endothelial cell-specific Tie2/Tek promoter identifies unique protein-binding elements. *Biochem J*, 1998, 330 (Pt 1), 335–343.
- Fischer A., Schumacher N., Maier M., Sendtner M., Gessler M., The Notch target genes Hey1 and Hey2 are required for embryonic vascular development. *Genes Dev*, 2004, 18, 901–911.
- Fish J.E., Matouk C.C., Rachlis A., Lin S., Tai S.C., D'Abreo C., Marsden P.A., The expression of endothelial nitric-oxide synthase is controlled by a cell-specific histone code. *J Biol Chem*, 2005, 280, 24824–24838.
- Gavard J., Gutkind J.S., VEGF controls endothelial-cell permeability by promoting the beta-arrestin-dependent endocytosis of VE-cadherin. *Nat Cell Biol*, 2006, 8, 1223–1234.
- Gnanapandithen K., Chen Z., Kau C.L., Gorczynski R.M., Marsden P.A., Cloning and characterization of murine endothelial constitutive nitric oxide synthase. *Biochim Biophys Acta*, 1996, 1308, 103–106.
- Gory S., Dalmon J., Prandini M.-H., Kortulewski T., de Launoit Y., Huber P., Requirement of a GT box (Sp1 site) and two Ets binding sites for vascular endothelial cadherin gene transcription. *J Biol Chem*, 1998, 273, 6750–6755.
- Gory S., Vernet M., Laurent M., Dejana E., Dalmon J., Huber P., The vascular endothelial-cadherin promoter directs endothelial-specific expression in transgenic mice. *Blood*, 1999, 93, 184–192.
- Guan J., Guillot P.V., Aird W.C., Characterization of the mouse von Willebrand factor promoter. *Blood*, 1999, 94, 3405–3412.
- Guillot P.V., Guan J., Liu L., Kuivenhoven J.A., Rosenberg R.D., Sessa W.C., Aird W.C., A vascular bed-specific pathway. *J Clin Invest*, 1999, 103, 799–805.
- Hirai H., Samokhvalov I.M., Fujimoto T., Nishikawa S., Imanishi J., Nishikawa S., Involvement of Runx1 in the down-regulation of fetal liver kinase-1 expression during transition of endothelial cells to hematopoietic cells. *Blood*, 2005, 106, 1948–1955.
- Hisatsune H., Matsumura K., Ogawa M., Uemura A., Kondo N., Yamashita J.K., Katsuta H., Nishikawa S.,

- Chiba T., High level of endothelial cell-specific gene expression by a combination of the 5' flanking region and the 5' half of the first intron of the VE-cadherin gene. *Blood*, 2005, 105, 4657–4663.
- Huber P., Dalmon J., Engiles J., Breviario F., Gory S., Siracusa L.D., Buchberg A.M., Dejana E., Genomic structure and chromosomal mapping of the mouse VE-cadherin gene (*Cdh5*). *Genomics*, 1996, 32, 21–28.
- Huminiecki L., Gorn M., Suchting S., Poulson R., Bicknell R., Magic roundabout is a new member of the roundabout receptor family that is endothelial specific and expressed at sites of active angiogenesis. *Genomics*, 2002, 79, 547–552.
- Ijijn K., Dube A., Kontusaari S., Korhonen J., Lahtinen I., Oettgen P., Alitalo K., Role of Ets factors in the activity and endothelial cell specificity of the mouse Tie gene promoter. *Faseb J*, 1999, 13, 377–386.
- Jahroudi N., Ardekani A.M., Greenberger J.S., An NF1-like protein functions as a repressor of the von Willebrand factor promoter. *J Biol Chem*, 1996, 271, 21413–21421.
- Jahroudi N., Lynch D.C., Endothelial-cell-specific regulation of von Willebrand factor gene expression. *Mol Cell Biol*, 1994, 14, 999–1008.
- Janel N., Schwachtgen J.L., Bakhshi M.R., Barek L., Meyer D., Kerbirou-Nabias D., Comparison of the 5'-flanking sequences of the human and bovine von Willebrand factor-encoding genes reveals alternation of highly homologous domains with species-specific Alu-type repeats. *Gene*, 1995, 167, 291–295.
- Kallianpur A.R., Jordan J.E., Brandt S.J., The SCL/TAL-1 gene is expressed in progenitors of both the hematopoietic and vascular systems during embryogenesis. *Blood*, 1994, 83, 1200–1208.
- Kappel A., Ronicke V., Damert A., Flamme I., Risau W., Breier G., Identification of vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor-2 (Flk-1) promoter/enhancer sequences sufficient for angioblast and endothelial cell-specific transcription in transgenic mice. *Blood*, 1999, 93, 4284–4292.
- Kappel A., Schlaeger T.M., Flamme I., Orkin S.H., Risau W., Breier G., Role of SCL/Tal-1, GATA, and Ets transcription factor binding sites for the regulation of Flk-1 expression during murine vascular development. *Blood*, 2000, 96, 3078–3085.
- Karantzoulis-Fegaras F., Antoniou H., Lai S.L., Kulkarni G., D'Abreo C., Wong G.K., Miller T.L., Chan Y., Atkins J., Wang Y., Marsden P.A., Characterization of the human endothelial nitric-oxide synthase promoter. *J Biol Chem*, 1999, 274, 3076–3093.
- Korhonen J., Lahtinen I., Halmekyto M., Alhonen L., Janne J., Dumont D., Alitalo K., Endothelial-specific gene expression directed by the tie gene promoter in vivo. *Blood*, 1995, 86, 1828–1835.
- Landry J.R., Kinston S., Knezevic K., Donaldson I.J., Green A.R., Gottgens B., Fli1, Elf1, and Ets1 regulate the proximal promoter of the LMO2 gene in endothelial cells. *Blood*, 2005, 106, 2680–2687.
- Laumonier Y., Nadaud S., Agrapart M., Soubrier F., Characterization of an upstream enhancer region in the promoter of the human endothelial nitric-oxide synthase gene. *J Biol Chem*, 2000, 275, 40732–40741.
- Lawson N.D., Scheer N., Pham V.N., Kim C.H., Chitnis A.B., Campos-Ortega J.A., Weinstein B.M., Notch signaling is required for arterial-venous differentiation during embryonic vascular development. *Development*, 2001, 128, 3675–3683.
- Le Bras A., Lionneton F., Mattot V., Lelièvre E., Caetano B., Spruyt N., Soncin F., HIF-2alpha specifically activates the VE-cadherin promoter independently of hypoxia and in synergy with Ets-1 through two essential ETS-binding sites. *Oncogene*, 2007,
- Lelièvre E., Mattot V., Huber P., Vandenbunder B., Soncin F., Ets1 lowers capillary endothelial cell density at confluence and induces the expression of VE-cadherin., *Oncogene*, 2000, 19, 2438–2446.
- Liu F., Walmsley M., Rodaway A., Patient R., Fli1 acts at the top of the transcriptional network driving blood and endothelial development. *Curr Biol*, 2008, 18, 1234–1240.
- Marsden P.A., Heng H.H., Scherer S.W., Stewart R.J., Hall A.V., Shi X.M., Tsui L.C., Schappert K.T., Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene. *J Biol Chem*, 1993, 268, 17478–17488.
- Millauer B., Wizigmann-Voos S., Schnurch H., Martinez R., Moller N.P., Risau W., Ullrich A., High affinity VEGF binding and developmental expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis. *Cell*, 1993, 72, 835–846.
- Mochida S., Ishikawa K., Inao M., Shibuya M., Fujiwara K., Increased expressions of vascular endothelial growth factor and its receptors, flt-1 and KDR/flk-1, in regenerating rat liver. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996, 226, 176–179.
- Mollica L.R., Crawley J.T., Liu K., Rance J.B., Cockerill P.N., Follows G.A., Landry J.R., Wells D.J., Lane D.A., Role of a 5'-enhancer in the transcriptional regulation of the human endothelial cell protein C receptor gene. *Blood*, 2006, 108, 1251–1259.
- Morishita K., Johnson D.E., Williams L.T., A novel promoter for vascular endothelial growth factor receptor (flt-1) that confers endothelial-specific gene expression. *J Biol Chem*, 1995, 270, 27948–27953.
- Okada Y., Jin E., Nikolova-Krstevski V., Yano K., Liu J., Beeler D., Spokes K., Kitayama M., Funahashi N., Doi T., Janes L., Minami T., Oettgen P., Aird W.C., A GABP-binding element in the Robo4 promoter is necessary for endothelial expression *in vivo*. *Blood*, 2008, 112, 2336–2339.
- Okada Y., Yano K., Jin E., Funahashi N., Kitayama M., Doi T., Spokes K., Beeler D.L., Shih S.C., Okada H., Danilov T.A., Maynard E., Minami T., Oettgen P., Aird W.C., A three-kilobase fragment of the human Robo4 promoter directs cell type-specific expression in endothelium. *Circ Res*, 2007, 100, 1712–1722.
- Park K.W., Morrison C.M., Sorensen L.K., Jones C.A., Rao Y., Chien C.B., Wu J.Y., Urness L.D., Li D.Y., Robo4 is a vascular-specific receptor that inhibits endothelial migration. *Dev Biol*, 2003, 261, 251–267.

- Patterson C., Perrella M.A., Hsieh C.M., Yoshizumi M., Lee M.E., Haber E., Cloning and functional analysis of the promoter for KDR/flk-1, a receptor for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem*, 1995, 270, 23111–23118.
- Patterson C., Wu Y., Lee M.E., DeVault J.D., Runge M.S., Haber E., Nuclear protein interactions with the human KDR/flk-1 promoter in vivo. Regulation of Sp1 binding is associated with cell type-specific expression. *J Biol Chem*, 1997, 272, 8410–8416.
- Peng Y., Jahroudi N., The NFY transcription factor functions as a repressor and activator of the von Willebrand factor promoter. *Blood*, 2002, 99, 2408–2417.
- Peng Y., Jahroudi N., The NFY transcription factor inhibits von Willebrand factor promoter activation in non-endothelial cells through recruitment of histone deacetylases. *J Biol Chem*, 2003, 278, 8385–8394.
- Peters K.G., Coogan A., Berry D., Marks J., Iglehart J.D., Kontos C.D., Rao P., Sankar S., Trogan E., Expression of Tie2/Tek in breast tumour vasculature provides a new marker for evaluation of tumour angiogenesis. *Br J Cancer*, 1998, 77, 51–56.
- Piovella F., Nalli G., Malamani G.D., Majolino I., Frassoni F., Sitar G.M., Ruggeri A., Dell'Orbo C., Ascari E., The ultrastructural localization of factor VIII-antigen in human platelets, megakaryocytes and endothelial cells utilizing a ferritin-labelled antibody. *Br J Haematol*, 1978, 39, 209–213.
- Plate K.H., Breier G., Millauer B., Ullrich A., Risau W., Up-regulation of vascular endothelial growth factor and its cognate receptors in a rat glioma model of tumor angiogenesis. *Cancer Res*, 1993, 53, 5822–5827.
- Prandini M.H., Dreher I., Bouillot S., Benkerri S., Moll T., Huber P., The human VE-cadherin promoter is subjected to organ-specific regulation and is activated in tumour angiogenesis. *Oncogene*, 2005, 24, 2992–3001.
- Pugh B.F., Tjian R., Transcription from a TATA-less promoter requires a multisubunit TFIID complex. *Genes Dev*, 1991, 5, 1935–1945.
- Robb G.B., Carson A.R., Tai S.C., Fish J.E., Singh S., Yamada T., Scherer S.W., Nakabayashi K., Marsden P.A., Post-transcriptional regulation of endothelial nitric-oxide synthase by an overlapping antisense mRNA transcript. *J Biol Chem*, 2004, 279, 37982–37996.
- Robb L., Elwood N.J., Elefanty A.G., Kontgen F., Li R., Barnett L.D., Begley C.G., The scl gene product is required for the generation of all hematopoietic lineages in the adult mouse. *Embo J*, 1996, 15, 4123–4129.
- Ronicke V., Risau W., Breier G., Characterization of the endothelium-specific murine vascular endothelial growth factor receptor-2 (Flk-1) promoter. *Circ Res*, 1996, 79, 277–285.
- Schlaeger T.M., Bartunkova S., Lawitts J.A., Teichmann G., Risau W., Deutsch U., Sato T.N., Uniform vascular-endothelial-cell-specific gene expression in both embryonic and adult transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997, 94, 3058–3063.
- Schlaeger T.M., Qin Y., Fujiwara Y., Magram J., Sato T.N., Vascular endothelial cell lineage-specific promoter in transgenic mice. *Development*, 1995, 121, 1089–1098.
- Schniirch H., Risau W., Expression of tie-2, a member of a novel family of receptor tyrosine kinases, in the endothelial cell lineage. *Development*, 1993, 119, 957–968.
- Schwachtgen J.L., Janel N., Barek L., Duterque-Coquillaud M., Ghysdael J., Meyer D., Kerbirou-Nabias D., Ets transcription factors bind and transactivate the core promoter of the von Willebrand factor gene. *Oncogene*, 1997, 15, 3091–3102.
- Schwachtgen J.L., Remacle J.E., Janel N., Brys R., Huylebroeck D., Meyer D., Kerbirou-Nabias D., Oct-1 is involved in the transcriptional repression of the von Willebrand factor gene promoter. *Blood*, 1998, 92, 1247–1258.
- Sessa W.C., The nitric oxide synthase family of proteins. *J Vasc Res*, 1994, 31, 131–143.
- Shimokawa T., Ra C., C/EBPalpha functionally and physically interacts with GABP to activate the human myeloid IgA Fc receptor (Fc alphaR, CD89) gene promoter. *Blood*, 2005, 106, 2534–2542.
- Shirayoshi Y., Yuasa Y., Suzuki T., Sugaya K., Kawase E., Ikemura T., Nakatsuji N., Proto-oncogene of int-3, a mouse Notch homologue, is expressed in endothelial cells during early embryogenesis. *Genes Cells*, 1997, 2, 213–224.
- Shore V.H., Wang T.H., Wang C.L., Torry R.J., Caudle M.R., Torry D.S., Vascular endothelial growth factor, placenta growth factor and their receptors in isolated human trophoblast. *Placenta*, 1997, 18, 657–665.
- Smith J.M., Meinkoth J.H., Hochstatter T., Meyers K.M., Differential distribution of von Willebrand factor in canine vascular endothelium. *Am J Vet Res*, 1996, 57, 750–755.
- Teichert A.M., Karantzoulis-Fegaras F., Wang Y., Mawji I.A., Bei X., Gnanapandithen K., Marsden P.A., Characterization of the murine endothelial nitric oxide synthase promoter. *Biochim Biophys Acta*, 1998, 1443, 352–357.
- Teichert A.M., Miller T.L., Tai S.C., Wang Y., Bei X., Robb G.B., Phillips M.J., Marsden P.A., *In vivo* expression profile of an endothelial nitric oxide synthase promoter-reporter transgene. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2000, 278, H1352–H1361.
- Valter M.M., Hugel A., Huang H.J., Cavenee W.K., Wiestler O.D., Pietsch T., Wernert N., Expression of the Ets-1 transcription factor in human astrocytomas is associated with Fms-like tyrosine kinase-1 (Flt-1)/vascular endothelial growth factor receptor-1 synthesis and neoangiogenesis. *Cancer Res*, 1999, 59, 5608–5614.
- Venema R.C., Nishida K., Alexander R.W., Harrison D.G., Murphy T.J., Organization of the bovine gene encoding the endothelial nitric oxide synthase. *Biochim Biophys Acta*, 1994, 1218, 413–420.
- Visvader J.E., Fujiwara Y., Orkin S.H., Unsuspected role for the T-cell leukemia protein SCL/tal-1 in vascular development. *Genes Dev*, 1998, 12, 473–479.

- Wadman I.A., Osada H., Grutz G.G., Agulnick A.D., Westphal H., Forster A., Rabbitts T.H., The LIM-only protein Lmo2 is a bridging molecule assembling an erythroid, DNA-binding complex which includes the TAL1, E47, GATA-1 and Ldb1/NLI proteins. *Embo J*, 1997, 16, 3145–3157.
- Wakiya K., Bègue A., Stehelin D., Shibuya M., A cAMP response element and an Ets motif are involved in the transcriptional regulation of flt-1 tyrosine kinase (vascular endothelial growth factor receptor 1) gene., *J Biol Chem*, 1996, 271, 30823–30828.
- Wang X., Peng Y., Ma Y., Jahroudi N., Histone H1-like protein participates in endothelial cell-specific activation of the von Willebrand factor promoter. *Blood*, 2004, 104, 1725–1732.
- Wei C., Jiang S., Lust J.A., Daly R.C., McGregor C.G., Genetic expression of endothelial nitric oxide synthase in human atrial myocardium. *Mayo Clin Proc*, 1996, 71, 346–350.
- Wilcox J.N., Subramanian R.R., Sundell C.L., Tracey W.R., Pollock J.S., Harrison D.G., Marsden P.A., Expression of multiple isoforms of nitric oxide synthase in normal and atherosclerotic vessels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997, 17, 2479–2488.
- Wu J., Iwata F., Grass J.A., Osborne C.S., Elnitski L., Fraser P., Ohneda O., Yamamoto M., Bresnick E.H., Molecular determinants of NOTCH4 transcription in vascular endothelium. *Mol Cell Biol*, 2005, 25, 1458–1474.
- Yamaguchi T.P., Dumont D.J., Conlon R.A., Breitman M.L., Rossant J., Flk-1, an flt-related receptor tyrosine kinase is an early marker for endothelial cell precursors., *Development*, 1993, 118, 489–498.
- Zhang J., Patel J.M., Block E.R., Molecular cloning, characterization and expression of a nitric oxide synthase from porcine pulmonary artery endothelial cells. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 1997, 116, 485–491.