

Université de Montréal

Développement d'un modèle de souris transgénique pour l'étude des effets de
l'angiotensine II sur le comportement des macrophages *in vivo*.

par
Fannie Tremblay

Programmes de biologie moléculaire
Faculté des Études Supérieures (FES)

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention d'une Maîtrise ès Sciences (M.Sc.)
en biologie moléculaire

Décembre, 2001

©, Fannie Tremblay, 2001



QH
506
U54
2002
V.013

Université de Montréal
Faculté des Études Supérieures (FES)

Ce mémoire intitulé :

Développement d'un modèle de souris transgénique pour l'étude des effets de
l'angiotensine II sur le comportement des macrophages *in vivo*.

présenté par :

Fannie Tremblay

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Gaétan Thibault Ph.D.

Président-rapporteur

Timothy L. Reudelhuber Ph.D.

Directeur de recherche

Jeffrey Cohn Ph.D.

membre du jury

RÉSUMÉ

Problématique : Les conséquences de l'athérosclérose comptent pour la majeure partie de la mortalité dans les sociétés occidentales. Cette forme chronique d'inflammation résulte de multiples facteurs génétiques et environnementaux, dont l'hypertension artérielle. Des expériences *in vitro* et d'autres utilisant des modèles animaux ont identifié l'angiotensine II (Ang II) comme facteur pouvant accroître le développement de l'athérosclérose. Plusieurs molécules impliquées dans l'adhésion des monocytes à l'endothélium et dans leur migration dans l'intima verraient leur activité ou leur expression augmentée par l'Ang II. Cependant, la question persiste à savoir si ce peptide vasoactif contribue à l'athérosclérose directement ou indirectement via son effet vasopresseur. Mieux comprendre les mécanismes de l'athérogénèse pourrait aider à identifier de nouvelles thérapies. **Hypothèse et projet de recherche :** Ce projet propose que l'Ang II influence directement le comportement invasif des macrophages *in vivo*. Il vise à : 1) Générer des souris transgéniques dont les macrophages libèrent l'Ang II; 2) Caractériser ces souris au niveau de l'expression du transgène et de l'invasion des tissus par les macrophages. **Méthodologie :** 1) Des macrophages ont été transfectés avec des constructions permettant l'expression de protéines de fusion dotées de sites furine. Les produits de clivage ont été mesurés par radio-immunoessai (RIA) et par essais enzymatiques. 2) Les promoteurs SR-A et gp91-PHOX ont été utilisés pour diriger l'expression d'une protéine de fusion permettant la relâche d'Ang II aux macrophages - et aux macrophages/monocytes - respectivement. 3) L'expression du transgène par les macrophages a été vérifiée par RNase protection et par RIA et la spécificité des promoteurs par RNase protection. Une RNase protection avec une sonde dérivée du gène macrophage spécifique F4/80 a permis d'évaluer le comportement invasif des macrophages. **Conclusions :** 1) Les macrophages contiennent la furine. 2) Des souris transgéniques ont été obtenues et croisées avec des souris C57BL/6. 3) Les promoteurs employés permettent l'expression du transgène par les macrophages mais leur spécificité n'a pas été confirmée. Les macrophages transgéniques ne semblent pas plus invasifs, mais une caractérisation plus approfondie du modèle sera nécessaire.

Mots clés :

Angiotensine II

Athérosclérose

Hypertension

Système rénine-angiotensine

Macrophages

Molécules d'adhésion

ABSTRACT

Background : The sequelae of atherosclerosis represent the most common cause of death in Westernised Societies. This chronic kind of arterial inflammation and injury results from many genetic and environmental factors. Hypertension is one of them. In vitro experiments and others using animal models have revealed angiotensin II (Ang II) as a factor able to increase the development of atherosclerosis. Many molecules involved in adhesion of monocytes to the endothelium and in their migration into the intima have their activity or expression increased by Ang II. However, it is still unclear whether this vasoactive peptide contributes to atherosclerosis directly or indirectly by its vasopressor action. A better understanding of mechanisms of atherogenesis could lead to the development of new therapies. **Hypothesis and research project :** This project proposes that Ang II directly influences the invasiveness of macrophages in vivo. It aims to: 1) Verify the presence of furin in macrophages; 2) Generate transgenic mice with Ang II-releasing macrophages; 3) Characterise these mice for the expression of the transgene and the invasion of tissues by macrophages. **Methods :** 1) Macrophages were transfected with constructs allowing the expression of fusion proteins with furin sites. Cleavage products were measured by radioimmunoassay (RIA) and enzymatic assay. 2) S-RA and gp91-PHOX promoters were used to target expression of a fusion protein leading to the release of Ang II by macrophages - and by macrophages/monocytes - respectively. 3) Expression of the transgene by macrophages was assayed by RNase protection and RIA and the specificity of the promoters by RNase protection. An RNase protection using a probe derived from the macrophage-specific gene F4/80 allowed the determination of the invasiveness of macrophages. **Conclusions :** 1) Macrophages contain furin. 2) Transgenic mice were obtained and crossed into the C57BL/6 strain. 3) The promoters used allowed expression of the transgenes by macrophages but their specificity haven't been confirmed. Transgenic macrophages do not seem more invasive as compared to control but the model needs to be characterised further.

Key words :

Angiotensin II

Atherosclerosis

Hypertension

Renin-angiotensin system

Macrophages

Adhesion molecules

TABLE DES MATIÈRES

Identification du jury	ii
Résumé	iii
Abstract	iv
Table des matières	v
Liste des tableaux	x
Liste des figures	xi
Liste des sigles et abréviations	xiii
Dédicace	xv
Remerciements	xvi
Avant-propos	xvii
1. CHAPITRE I : INTRODUCTION	1
1.1. Athérosclérose: statistiques et conséquences	1
1.2. Modèle de formation des plaques d'athérosclérose	2
1.2.1. Événement initial : la modification des lipoprotéines	4
1.2.2. Le recrutement des macrophages et des monocytes	5
1.2.3. La migration des monocytes dans la paroi artérielle	7
1.2.4. La formation de macrophages de type cellules spumeuses	8
1.2.5. La progression de la lésion	8
1.3. Le système rénine-angiotensine	9
1.3.1. Le système rénine-angiotensine circulant	9
1.3.1.1. La production d'angiotensine II	9
1.3.1.2. Les récepteurs d'angiotensine II	9
1.3.1.3. Régulation de la sécrétion de rénine	11

1.3.1.3.1. Mécanismes intrarénaux.....	12
1.3.1.3.2. Nerfs rénaux.....	12
1.3.1.3.3. Agents humoraux.....	13
1.3.1.4. Le RAS dans régulation de la pression et de l'homéostasie des fluides extracellulaires.....	14
1.3.1.5. Le système nerveux central dans la régulation de la pression et de l'homéostasie des fluides extracellulaires.....	15
1.3.1.6. Le RAS et l'hypertension artérielle.....	16
1.3.2. Les systèmes rénine-angiotensine tissulaires.....	17
1.4. Relations entre le RAS et l'athérosclérose.....	17
1.4.1. Rôle de l'hypertension dans l'athérogénèse.....	17
1.4.2. Effets de l'Ang II sur différentes cellules impliquées dans la formation des lésions.....	19
1.4.2.1. Études réalisées <i>in vitro</i>	21
1.4.2.2. Études réalisées <i>in vivo</i>	22
1.4.2.3. Effet de l'inhibition de l'ACE sur le développement des lésions.....	23
1.4.2.4. Effet du blocage des récepteurs AT ₁ sur le développement des lésions.....	23
1.5. Limitations des résultats actuels: les conclusions ne sont pas les mêmes pour tous les modèles d'athérosclérose étudiés.....	25
1.6. Hypothèse de travail.....	25
1.7. Projet de recherche.....	26
2. CHAPITRE II : MATÉRIEL ET MÉTHODES	27
2.1. Matériel.....	27
2.2. Vérification de la présence de furine dans les macrophages.....	33
2.2.1. Traitement des cellules et des surnageants pour RIA.....	33

2.2.2.	Préparation des surnageants.....	33
2.2.3.	Préparation des cellules.....	36
2.2.4.	Détection de l'Ang II par radio-immunoassai (RIA).....	36
2.2.5.	Essais enzymatiques de la rénine des surnageants.....	37
2.2.6.	RIA pour détecter l'Ang I produite lors de la réaction enzymatique de la rénine avec son substrat.....	38
2.3.	Génération des souris transgéniques:.....	38
2.3.1.	Préparation des constructions d'ADN pour la transgénèse.....	38
2.3.2.	Séquençage des constructions.....	39
2.3.3.	Préparation de l'ADN pour l'envoyer à la micro-injection.....	39
2.4.	Identification les souris positives pour le transgène parmi les fondateurs potentiels.....	40
2.4.1.	Préparation de l'ADN.....	40
2.4.2.	Conditions de PCR pour les souris SR-A et PHOX.....	40
2.5.	RNase protection sur l'ARN de macrophages.....	41
2.5.1.	Stimulation des macrophages de la cavité péritonéale des souris transgéniques..	41
2.5.2.	Isolation de l'ARN des macrophages.....	41
2.5.3.	RNase protection pour vérifier l'expression du transgène :méthode détaillée. .	42
2.5.3.1.	Synthèse d'une échelle de poids moléculaire radioactive.....	42
2.5.3.2.	Digestion des matrices d'ADN.....	43
2.5.3.3.	Synthèse des sondes.....	43
2.5.3.4.	Digestion aux RNAses.....	43
2.6.	<i>Southern blot</i> pour identifier les lignées.....	46
2.6.1.	Préparation de l'ADN génomique.....	46
2.6.2.	Synthèse de la sonde.....	46

2.6.3.	Préhybridation et hybridation.	46
2.7.	RIA pour doser l'Ang II des macrophages de souris transgéniques.	47
2.7.1.	Traitement des surnageants des cellules intrapéritonéales.	47
2.8.	RNAse protection sur ARN de tissus.	47
2.9.	Développement d'un essai pour quantifier les macrophages présents dans les tissus.	47
2.9.1.	Clonage d'une portion du gène f4/80 (expression spécifique aux macrophages) par PCR.	47
2.9.2.	Synthèse d'une sonde radioactive.	48
3.	CHAPITRE III: RÉSULTATS	49
3.1.	Vérification de la présence de la furine dans les macrophages.	49
3.2.	Transgénèse et identification des souris transgéniques.	53
3.3.	Expression du transgène par les macrophages.	53
3.4.	Suivi des lignées par <i>Southern Blot</i>	55
3.5.	Détection de l'ANG II produite par les macrophages des souris transgéniques. ...	64
3.6.	Vérification de la spécificité d'expression du transgène.	64
3.7.	Quantification des macrophages dans les tissus par RNAse protection.	64
4.	CHAPITRE IV: DISCUSSION ET CONCLUSIONS	73
4.1.	Applications potentielles du modèle développé.	73
4.2.	Libération d'Ang II par les macrophages : vérification de la présence de la furine.	74
4.3.	Transgénèse et identification des souris positives par PCR.	76
4.4.	Vérification de l'expression du transgène par les macrophages.	77
4.5.	Suivi des lignées par <i>Southern Blot</i>	78
4.6.	RIA : libération de l'Ang II par les macrophages.	79

4.7.	Vérification de la spécificité de l'expression du transgène.	79
4.8.	Clonage de F4/80 et Test RNase sur ARNs de macrophages.....	81
4.9.	Quantification des macrophages par RNase protection avec la sonde F4/80.	81
4.10.	Conclusions et perspectives futures.....	83
	Liste de références.....	85

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I:	États physiologiques et facteurs de risque associés à l'athérosclérose.....	2
Tableau II:	Exemples de gènes qui influencent le développement de l'athérosclérose chez la souris hypercholestérolémique.....	3
Tableau III:	Première étape du RIA servant à détecter l'Ang II.....	37

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1	Représentation schématique du modèle d'initiation des lésions d'athérosclérose.....	6
Figure 1.2	Représentation schématique du système rénine-angiotensine (RAS) circulant.....	10
Figure 1.3	Relations entre l'Ang II, l'hypertension et l'athérogénèse.....	18
Figure 2.1	Représentation schématique de l'approche expérimentale utilisée.....	28/29
Figure 2.2	Représentation schématique de la technologie permettant la relâche directe d'Ang II par une cellule donnée.....	34
Figure 2.3	Représentation schématique de la prorénine-furine.....	35
Figure 2.4	Représentation schématique des matrices d'ADN utilisées pour la synthèse de sondes d'ARN.....	44/45
Figure 3.1	Représentation schématique de la stratégie permettant la vérification de la présence de la furine dans une cellule donnée.....	51/52
Figure 3.2	Constructions d'ADN réalisées pour la transgénèse et réaction de polymérisation en chaîne (PCR) pour la détection des transgéniques.....	54
Figure 3.3	Visualisation de l'ARN isolé de macrophages transgéniques.....	56
Figure 3.4	Expression du transgène chez les souris SR-A et PHOX.....	57/58

Figure 3.5	Représentation schématique du <i>Southern Blot</i> développé pour le suivi des lignées.....	60
Figure 3.6	Comparaison entre les patrons de <i>Southern Blot</i> et l'expression du transgène pour des souris de la même lignée.....	61
Figure 3.7	Suivi des lignées par <i>Southern Blot</i>	62/63
Figure 3.8	Détection de l'Ang II des macrophages par RIA.....	65
Figure 3.9	Distribution tissulaire de l'expression du transgène.....	66
Figure 3.10	Clonage du gène F4/80 macrophage spécifique.....	68
Figure 3.11	Vérification du niveau d'expression du F4/80 dans les macrophages par RNase protection.....	69
Figure 3.12	F4/80 comme marqueur de la présence de macrophages dans les tissus par RNase protection.....	71/72

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

ACE	<i>angiotensin converting enzyme</i>
Amp	ampicilline
Ang I	angiotensine I
Ang II	angiotensine II
AP-1	<i>activator protein-1</i>
apoB	apolipoprotéine B
apoE	apolipoprotéine E
ADN	acide désoxyribonucléique
ADN pol	ADN polymérase
Agt	angiotensinogène
ARN	acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ARN pol	ARN polymérase
ARNt	ARN de transfert
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
CCR2	<i>CC chemokine receptor 2</i>
CD36	<i>cluster of differentiation 36</i>
CIAP	<i>calf intestinal alkaline phosphatase</i>
Cpm	comptes par minute
CS-1	domaine connecteur de la fibronectine-1
CXCR2	<i>CXC-chemokine receptor 2</i>
dATP	désoxyadénosine 5'-triphosphate
dCTP	désoxycytosine 5'-triphosphate
dGTP	désoxyguanosine 5'-triphosphate
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
D.O.	densité optique
DTT	dithiotréitol
dTTP	désoxythymidine 5'-triphosphate
dUTP	désoxyuridine 5'-triphosphate
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EtBr	bromure d'éthydiuim
ÉtOH	éthanol
Ets	<i>E26 transformation specific</i>
FC	portion Fc d'immunoglobuline
FCS	<i>fetal calf serum</i>
HCAECs	<i>human coronary arteries endothelial cells</i>
¹²⁵ I	iode 125
ICAM-1	<i>intercellular adhesion molecule-1</i>
IgG	immunoglobuline G
IL-8	interleukine-8
IL-10	interleukine 10
INF λ	interféron gamma
iNOS	<i>inducible nitric oxide synthase</i>

LB Broth	<i>Lennox L broth</i>
LDL	<i>low density lipoprotein</i>
LDLox	<i>low density lipoprotein oxydée</i>
LDL-R	récepteur des LDLs
LiCl	chlorure de lithium
12/15-LO	12/15-lipoxygénase
MAP	<i>mitogen activated protein</i>
MCP-1	<i>monocyte chemottractant protein-1</i>
M-CSF	<i>macrophage colony-stimulating factor</i>
MétOH	méthanol
mg	milligramme
min	minute
ml	millilitres
mM	millimolaire
NCBI	<i>National center for biotechnology information</i>
NF- κ B	<i>kappa immunoglobulin enhancer-binding protein</i>
NRS	<i>normal rabbit serum</i>
8-OH	8-hydroxyquinolone
PBS	<i>phosphate buffer saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PEG	polyéthylène-glycol
PMSF	phenylmethylsulfonyl fluoride
PNK	polynucléotides kinase
PPAR	<i>peroxisome proliferator-activated receptor</i>
PRO	segment pro de la prorénine humaine
PS	peptide signal
RAS	système rénine-angiotensine
rATP	riboadénosine triphosphate
rCTP	ribocytosine triphosphate
rGTP	riboguanosine triphosphate
RIA	radio-immunoessai
rTTP	ribothymidine triphosphate
rUTP	ribo-uridine triphosphate
SDS	sodium dodécyl sulfate
SR-A	<i>scavenger receptor-A</i>
SR-B1	<i>scavenger receptor-B1</i>
SSC	<i>Saline-sodium citrate</i>
TAB	<i>trypsin activation buffer</i>
T ₁₀ E ₁	Tris-EDTA
VCAM-1	<i>vascular cell adhesion molecule-1</i>
μCi	micro Curie
μg	microgramme
μl	microlitre
μM	micromolaire
VLA-4	<i>very late activated antigen-4</i>

DÉDICACE

J'aimerais dédier ce mémoire à tous ceux qui voient, avec ou sans leurs yeux, la beauté du monde. À tous ceux qui m'aident à la voir. À Hugo qui voit plus que ses yeux ne le prétendent. Que je vois partout. À ma famille. À Marilyne, Olivier et Noémie, mes petits frère et sœurs. Qu'ils gardent toujours leurs regards d'enfants. À ma mère et mon père. Et à Sébastien mon frère, qui verra un jour je l'espère... À tous ceux que j'aime.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier tous les membres du laboratoire. Tim, pour tes conseils et ton écoute. Pour ton aptitude à voir ce qu'il y a de meilleur en chacun. Nadheige, pour ce que tu m'a appris sur moi-même, et pour ton aide. Chantal, pour ton soutien technique hors du commun et pour ton sourire pétillant. Gary, pour tes conseils, ta jasette, et ton petit côté paternel! Sjors pour ta musique et ta voix, ton amitié et tes doutes. Merci à Angela que j'espère revoir. Merci à Viviane pour son soutien à plusieurs niveaux!

Merci au groupe d'Hypertension pour m'avoir permis mes premières expériences de communication scientifique.

Merci aux Docteurs Chritopher K. Glass et Stuart H. Orkin pour les promoteurs fournis et pour les conseils. Un merci tout particulier à Isabelle Brisson qui s'est occupée de gérer mes colonies de souris au SPF de l'IRCM. Merci aux membres du service de micro-injection de l'IRCM pour la génération des souris transgéniques.

Merci au CRSNG pour m'avoir supportée lors de ces deux années de maîtrise.

AVANT-PROPOS

Ce mémoire résume les travaux effectués dans le cadre du développement d'un modèle de souris transgénique permettant l'étude de la modulation du comportement invasif des macrophages *in vivo*. Dans le chapitre premier, l'état actuel des connaissances concernant l'influence de l'angiotensine II (Ang II) sur l'athérogénèse, plus particulièrement sur l'invasion de l'intima par les macrophages et l'initiation des lésions, est exposé. Sont également présentées dans ce chapitre les lacunes des modèles utilisés dans l'étude de l'athérogénèse. Finalement, le modèle de souris transgénique développé est présenté et ses avantages par rapport aux modèles existants sont exposés, notamment sa particularité de mimer un système-rénine-angiotensine vasculaire activé chez des animaux normotendus. Le second chapitre relate les méthodes ayant permis de générer ce modèle et de procéder à sa caractérisation. Les résultats obtenus sont présentés au chapitre trois. Dans le dernier chapitre, les résultats sont analysés de façon à évaluer la qualité du modèle développé et ils sont mis en perspective par rapport aux connaissances actuelles. Les avenues à emprunter pour l'utilisation de ce modèle à l'avancement des connaissances entourant le rôle de l'Ang II dans l'athérogénèse sont présentées.

1. CHAPITRE I : INTRODUCTION

1.1. Athérosclérose: statistiques et conséquences.

Le présent projet de recherche porte sur le développement d'un modèle facilitant l'étude du rôle du peptide vasoactif angiotensine II (Ang II) dans l'athérosclérose. Les causes les plus fréquentes de mort dans les sociétés occidentales sont les complications de l'athérosclérose. De façon générale, l'athérosclérose peut être considérée comme une forme chronique d'inflammation artérielle qui résulte d'interactions entre des lipoprotéines modifiées, des macrophages dérivés des monocytes, des cellules T, et des composantes normales de la paroi artérielle. Ce processus inflammatoire peut conduire au développement de lésions complexes (ou plaques) qui obstruent la lumière artérielle. La rupture des plaques et la thrombose qui s'en suit ont de graves conséquences, notamment les infarctus du myocarde et les accidents vasculaires cérébraux (Navab et al., 1996; Smith et al., 1995).

Parmi tous les facteurs génétiques et environnementaux associés à l'athérosclérose, la présence d'un haut niveau de cholestérol dans le sérum est le seul facteur qui peut à lui seul conduire au développement des plaques, tant chez l'humain que chez les modèles animaux. Ainsi, les premières études visant à mieux comprendre cette pathologie ont été dirigées vers la compréhension des mécanismes contrôlant la biosynthèse du cholestérol et son niveau dans le sérum. Ces études ont permis le développement des statines, médicaments réduisant le cholestérol et la mortalité cardio-vasculaire chez les patients hypercholestérolémiques (Goldstein et Brown, 1977). Cependant, chez certains individus susceptibles, ces médicaments n'ont pas permis la diminution de la progression de l'athérosclérose, ni de la mortalité qui lui est associée (Hobbs et al., 1990). De plus, les risques de mortalité associée aux maladies cardiaques coronariennes ne sont réduits que de 15% quand le niveau de cholestérol diminue de 10 pour cent grâce aux statines (Gould et al., 1998).

1.2. Modèle de formation des plaques d'athérosclérose.

Les statines n'étant pas pleinement efficaces, il s'est avéré essentiel de mieux comprendre l'athérogénèse afin d'identifier de nouvelles cibles pour les stratégies de prévention et de traitement. Plusieurs technologies émergentes ont apporté des réponses en grande quantité quant aux états physiologiques et aux molécules impliquées dans ce processus pathologique (Tableaux I et II). Ces expériences ont permis de développer un modèle représentant les mécanismes conduisant à l'initiation et à la progression des lésions.

Tableau I : États physiologiques et facteurs de risque associés à l'athérosclérose.

Facteurs comportant une composante génétique significative

- Niveaux élevés de LDL ou VLDL
- Niveaux de HDL bas
- Niveaux élevés de lipoprotéine (a)
- Hypertension
- Diabète
- Genre masculin
- Niveaux élevés d'homocystéine
- Niveaux élevés de facteurs hémostatiques (ex : fibrinogène)
- Syndromes métaboliques
- Résistance à l'insuline
- Obésité
- Historique familiale

Facteurs environnementaux

- Cigarette
- Sédentarité
- Diète riche en lipides
- Agents infectieux

(Glass et Witztum, 2001)

Tableau II : Exemples de gènes, autres que l'apoE (anti-athérogénique), qui influencent le développement de l'athérosclérose chez la souris hypercholestérolémique.

Gènes proathérogéniques					
Gène	Expérience	Fond génétique	Effet	Mécanisme proposé	Références
12/15-LO	Knock-out	apoE ^{-/-}	↓↓	↓oxydation des LDL	(Cyrus et al., 1999)
	Surexpression	LDL R ^{-/-}	↑	↑ oxydation des LDL	(Harats et al., 2000)
					(Detmers et al., 2000)
iNOS	Knock-out	apoE ^{-/-}	↓	↓oxydation des LDL	(Behr-Roussel et al., 2000)
M-CSF	Knock-out	apoE ^{-/-}	↓↓	↓ infiltration des φs	(Smith et al., 1995)
					(Getz, 1990)
MCP-1	Knock-out	LDL R ^{-/-}	↓↓	↓ infiltration des φs	(Gu et al., 1998)
		apoE ^{-/-}			(Gosling et al., 1999)
CCR2	Knock-out	apoE ^{-/-}	↓↓	↓ infiltration des φs	(Boring et al., 1998)
Sélectines (P/E)	K.o. combiné	LDL R ^{-/-}	↓	↓ adhérences des φs	(Dong et al., 1998)
CXRC-2	Knock-out	LDL R ^{-/-}	↓	↓ de la résidence des φs	(Boisvert et al., 1998)
SR-A	Knock-out	apoE ^{-/-}	↓	↓ capture des LDLox	(Suzuki et al., 1997)
CD36	Knock-out	apoE ^{-/-}	↓↓	↓ capture des LDLox	(Febbraio et al., 2000)
Récepteur d'INFλ	Knock-out	apoE ^{-/-}	↓	↓ réponse inflammatoire	(Gupta et al., 1997)
CD154	Knock-out	apoE ^{-/-}	↓	↓ signalisation CD40	(Lutgens et al., 1999)
IL-10	Knock-out	C57 BL/6J	↑	↑ réponse inflammatoire	(Pinderski-Oslund et al., 1999)
					(Mallat et al., 1999)
Gènes anti-athérogéniques					
Paraoxinase	Knock-out	apoE ^{-/-}	↑	↓ du nettoyage des LDLox	(Shih et al., 1999)
apoA-1	Knock-out	transgène apoB	↑	↓ transport inverse du cholestérol	(Voyiaki et al., 1998)
	Surexpression	apoE ^{-/-}	↓	↑ transport inverse du cholestérol	(Benoit et al., 1999)
		LDL R ^{-/-}			(Tangirala et al., 1999)
PPARλ	Knock-out	LDL R ^{-/-}	↑	Fonction des φs altérée	(Chawla et al., 2001)
	Agoniste	LDL R ^{-/-}	↓		(Li et al., 2000)
SR-B1	Knock-out	LDL R ^{-/-}	↑	↓ transport inverse du cholestérol	(Huszar et al., 2000)
	Surexpression	LDL R ^{-/-}	↓	↑ transport inverse du cholestérol	(Kozarsky et al., 2000)

Adapté de Glass, C.K. et Witztum, J. (Glass et Witztum, 2001). Légende : φs : macrophages.

1.2.1. Événement initial : la modification des lipoprotéines.

Selon le modèle actuel, l'accumulation dans l'intima de lipoprotéines athérogéniques dérivées du plasma serait l'événement initial lors de la formation des lésions athérosclérotiques lipidiques précoces (*fatty streak*). De toute évidence, cette accumulation enclenche des réactions cellulaires spécifiques (Getz, 1990). De plus, la taille et la complexité cellulaire des lésions augmentent à mesure que l'accumulation se poursuit. En conditions normales, des lipoprotéines sont également présentes dans l'intima, mais en moindre concentration. Le seuil à atteindre pour en arriver à leur accumulation et à des réactions cellulaires pathologiques - initialement une augmentation du nombre de macrophages et le développement de cellules spumeuses (macrophages remplis de lipides) - est inconnu.

Bien qu'il soit un protagoniste important, le niveau plasmatique de lipoprotéines n'est pas le seul déterminant de l'accumulation de cellules spumeuses dans différentes parties des artères. Les régions où se produit généralement l'accumulation sont soumises à des forces mécaniques qui favorisent la rétention des particules athérogéniques à la surface de la lumière des vaisseaux. L'influx vers l'intima serait augmenté dans ces régions.

Les lipoprotéines de faible densité (LDL) qui s'accumulent dans l'intima peuvent y être séquestrées par les composantes de la matrice extracellulaire, et par la suite modifiées par oxydation (Stary et al., 1994). Le stress oxydatif engendré dans la paroi artérielle, entre autres par la présence des LDL oxydées (LDLox), contribue à l'athérosclérose en augmentant la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires et l'infiltration des macrophages/monocytes, en altérant le tonus vasculaire et en activant les métalloprotéinases de la matrice (Griendling et al., 1997). Les lipoprotéines modifiées présentes dans l'espace subendothélial peuvent être captées par les macrophages via leur récepteur éboueur nécrophage de clairance de type A (SR-A). Les cellules musculaires lisses peuvent également capturer ces molécules, soit par leurs récepteurs de lipoprotéines ou par un récepteur *éboueur nécrophage de clairance*. Les lipoprotéines peuvent être dégradées et estérifiées pour l'entreposage ou stockées telles quelles.

1.2.2. Le recrutement des macrophages et des monocytes.

Le recrutement des monocytes à la paroi artérielle et leur différenciation subséquente en macrophages est à l'origine un mécanisme de protection qui permet l'élimination des particules de LDLox et des cellules apoptotiques, cytotoxiques et proinflammatoires. Cependant, leur accumulation progressive et l'entreposage de LDLox conduit au développement des lésions d'athérosclérose (Figure 1.1). Le recrutement des monocytes/macrophages dans les régions propices à la formation de lésions est régulé par des molécules d'adhésion exprimées à la surface des cellules endothéliales, des macrophages/monocytes et des cellules musculaires lisses vasculaires, en réponse à des stimuli proinflammatoires. Ce recrutement est également régulé par l'expression de gènes codant pour des molécules chimiotactiques.

Plusieurs études ont mis en évidence le rôle prépondérant joué par les cellules de lignées macrophagique/monocytaire dans l'athérogénèse. Par exemple, les souris ostéoporotiques (op) mutantes pour le gène codant pour le *macrophage colony stimulating factor* (M-CSF) montrent une absence quasi complète de macrophages. Or, elles sont extrêmement résistantes au développement de l'athérosclérose lorsqu'on les croise à des souris apoE^{-/-} (souris qui développent une athérosclérose sévère lorsque soumises à une diète riche en lipides, puisqu'elle ne possède pas l'apolipoprotéine E aidant au transport du cholestérol), malgré une augmentation des niveaux de cholestérol circulant (Smith et al., 1995) (Tableau I) (Getz, 1990). VCAM-1 est une autre molécule contribuant au recrutement des monocytes dans la paroi artérielle. Plusieurs études lui suggèrent un caractère athérogénique, puisque son expression est augmentée sur les cellules endothéliales dans des régions propices à la formation de lésions, qu'elle recrute les monocytes et qu'elle est régulée par des stimuli proinflammatoires (Cybulsky et Gimbrone, Jr., 1991). Les sélectines E et P participeraient également au recrutement des monocytes puisque les lésions sont réduites de 40% à 60% chez la souris apoE^{-/-} dépourvue de l'un ou l'autre de ces deux gènes (Dong et al., 1998). Toujours chez la souris apoE^{-/-}, la délétion de l'ICAM-1 résulte en une réduction du recrutement des monocytes aux sites des lésions (Collins et al., 2000). Aussi, l'administration chronique

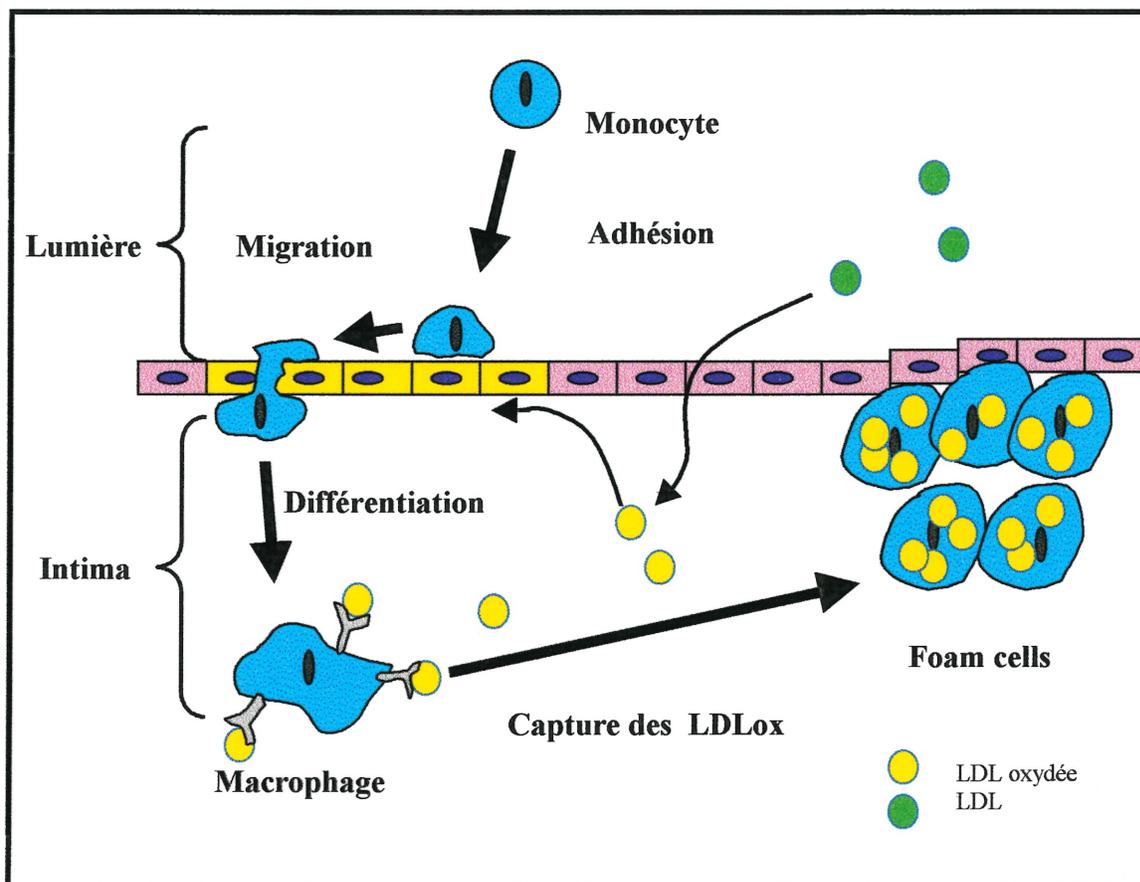


Figure 1.1 : Représentation schématique du modèle d'initiation des lésions d'athérosclérose. Les LDLs qui traversent la paroi y sont oxydés. Les LDL oxydées contribuent à augmenter l'expression de molécules d'adhésion sur les cellules endothéliales. Les monocytes circulants adhèrent à l'endothélium. Ils migrent dans l'intima où ils se différencient en macrophages. Les macrophages capturent de LDL oxydées, se différencient en foam cells et s'accumulent dans l'espace subendothélial.

d'un peptidomimétique correspondant au domaine connecteur-1 (CS-1) de la fibronectine-1, qui bloque la fonction de la molécule d'adhésion VLA-4 à la surface des leucocytes, réduit l'accumulation de monocytes dans un autre modèle de souris athérosclérotique (C57BL/6 suivant une diète athérogénique) (Shih et al., 1999). Ensemble, ces éléments suggèrent que plusieurs molécules d'adhésion et chimiotactiques contribuent au recrutement des monocytes/macrophages aux sites propices au développement de lésions, et que ce recrutement joue un rôle significatif dans l'athérogénèse.

1.2.3. La migration des monocytes dans la paroi artérielle.

Les LDL oxydées stimulent également l'entrée des monocytes dans la paroi artérielle, entre autres en les attirant directement (Steinberg et al., 1989). De façon indirecte, ils les attirent en stimulant l'expression de molécules chimiotactiques par les cellules endothéliales, notamment la *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1) (Navab et al., 1996). D'autre part, le récepteur de MCP-1, CCR2, situé à la surface des monocytes, est stimulé par l'hypercholestérolémie, et les monocytes dérivés de patients hypercholestérolémiques sont plus attirés par MCP-1 que des monocytes normaux (Steinberg et al., 1989). Aussi, l'inactivation des gènes codant pour MCP-1 ou CCR2 réduit l'athérosclérose de façon significative dans les souris apoE^{-/-} ou les souris surexprimant l'apoB (Boring et al., 1998; Gosling et al., 1999; Gu et al., 1998). D'autres molécules d'adhésion comme l'ICAM-1 et la sélectine P, pourraient être impliquées dans l'athérogénèse, puisque les souris apoE^{-/-} dépourvues de l'un ou l'autre de ces gènes ont une athérosclérose réduite (Collins et al., 2000). L'IL-8, présente dans les lésions chez l'humain, pourrait aussi jouer un rôle dans le trafic des monocytes/macrophages. Bien qu'aucun véritable homologue de l'IL-8 ne soit connu chez la souris, la reconstitution du système hématopoïétique de la souris déficiente pour le récepteur aux LDL (LDL-R) avec des cellules de moelle osseuse ne possédant pas le gène CXCR2, un des deux récepteurs de haute affinité pour l'IL-8 et les autres chémokines de type CXC, résulte en une diminution de l'athérosclérose par rapport à une souris reconstituée avec des cellules de moelle osseuse de type sauvage (Boisvert et al., 1998). Ensemble, ces données suggèrent que : l'inhibition de la chimotaxie des macrophages (médiée par MCP-1 et/ou

l'interférence avec l'activité CXCR-2), ainsi que l'inhibition de la fonction ou de l'expression de certaines molécules d'adhésion, pourraient apporter des bénéfices au niveau thérapeutique.

1.2.4. La formation de macrophages de type cellules spumeuses.

Les macrophages de type cellules spumeuses contiennent des quantités massives d'esters de cholestérol. Ils sont présents dans les lésions précoces et tardives. Dans les lésions, ils accumulent le cholestérol en le captant par leur récepteur SR-A (Yamada et al., 1998). Les souris apoE^{-/-} ne possédant pas le récepteur SR-A ou CD36 arborent des lésions réduites en superficie par rapport aux souris apoE^{-/-} contrôles (Suzuki et al., 1997; Febbraio et al., 2000).

1.2.5. La progression de la lésion.

La transition d'une lésion de nature lipidique vers une lésion plus complexe est caractérisée par la migration des cellules musculaires lisses de la média vers la lamina élastique interne et l'intima. Les cellules musculaires peuvent proliférer dans la lamina et accumuler des lipoprotéines modifiées, contribuer à la formation des cellules spumeuses, et synthétiser des protéines de matrice extracellulaire qui conduisent au développement du cap fibreux (Ross, 1999; Paulsson et al., 2000). Cette phase du développement de la lésion est influencée par des interactions entre les monocytes, les macrophages et les cellules T, qui mènent à un état d'inflammation chronique. C'est donc une réponse immunitaire qui module la progression de la lésion précoce lipidique vers une lésion complexe plus cellularisée. Les LDLoxs feraient partie des immunogènes responsables de cette réponse (Horkko et al., 2000). Bien que les lésions avancées conduisent souvent à l'ischémie en réponse à une réduction progressive de la lumière des vaisseaux, les événements cardio-vasculaires majeurs comme les infarctus du myocarde et l'apoplexie résulteraient plutôt de la rupture de la plaque et de la thrombose qui s'en suit (Davies et al., 1993; Lee et Libby, 1997).

1.3. Le système rénine-angiotensine.

1.3.1. Le système rénine-angiotensine circulant.

Du point de vu de l'évolution, la plus importante fonction du système rénine-angiotensine (RAS) est de maintenir constants le volume ainsi que la composition en électrolytes du liquide extracellulaire. Cette fonction est remplie par une combinaison d'effets intrarénaux et extrarénaux qui régulent l'excrétion du sel et de l'eau par les reins ainsi que l'ingurgitation de liquides (Fitzsimons, 1980; Hall, 1986; Hall et al., 1995; Laragh et Sealey, 1973; Laragh et Sealey, 1982). Cette fonction du RAS est étroitement reliée à la régulation de l'homéostasie circulatoire et à la régulation à long terme de la pression artérielle. Dans cette section seront donc résumés les mécanismes d'activation du RAS, et les conséquences de cette activation.

1.3.1.1. La production d'angiotensine II.

La production de l'angiotensine II (Ang II), principal effecteur du RAS, requiert plusieurs étape. La première est la sécrétion de rénine, une carboxypeptidase produite par le rein (Tigerstedt et Bergman, 1898). Elle clive le précurseur inactif angiotensinogène pour produire le décapeptide angiotensine I (Ang I). L'angiotensinogène origine du foie et circule continuellement à des niveaux qui sont rarement limitants pour la production d'Ang I (Sealey et Laragh, 1995). L'Ang I produite en circulation est convertie en l'octapeptide Ang II par l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE) vasculaire lors de son passage dans les poumons (Page et Helmer, 1940; Braun-Menendez et al., 1939; Skeggs et al., 1956) (Figure 1.2).

1.3.1.2. Les récepteurs d'angiotensine II.

Il existe deux principales isoformes de récepteurs pour l'Ang II: les types 1 (AT₁) et 2 (AT₂) (Chung et al., 1998; Edwards et Aiyar, 1993). Cette classification est basée sur leurs propriétés pharmacologiques et leurs réponses à différents antagonistes/agonistes, leurs voies de transduction du signal, et plus récemment sur le clonage de ces récepteurs (Brown et Douglas, 1992; Brown et Douglas, 1983; Chung et al., 1998; Douglas et al.,

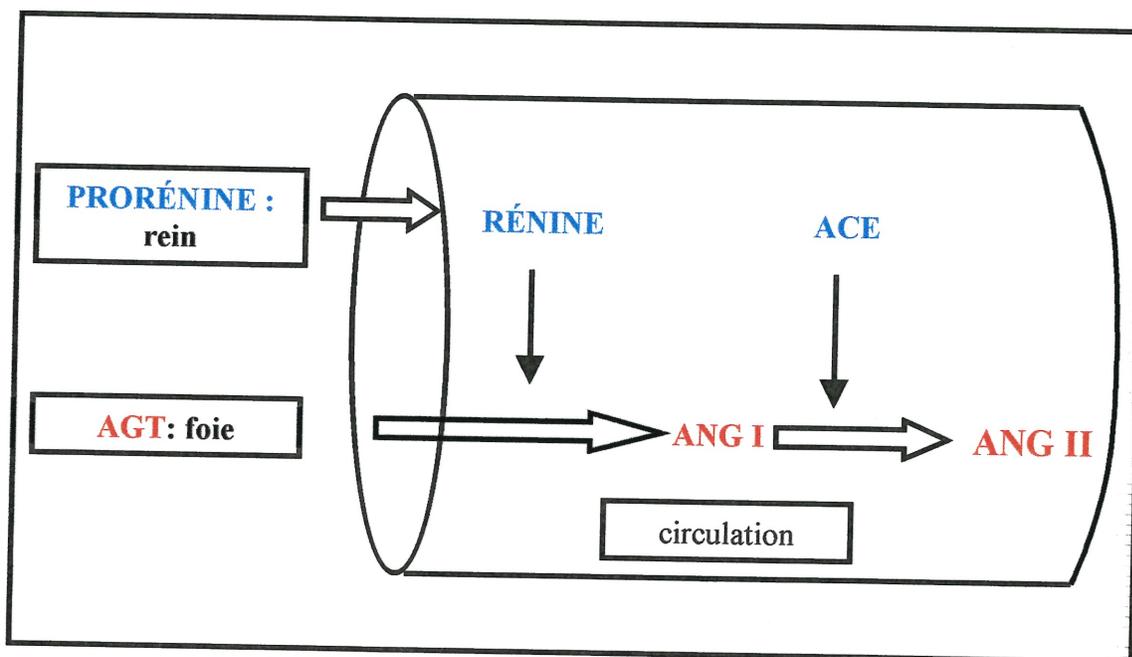


Figure 1.2 : Représentation schématique du système rénine-angiotensine (RAS) circulant. La prorénine produite par le rein est activée en circulation, où elle clive l'angiotensinogène (AGT) provenant du foie. L'angiotensine I (ANG I) produite est ensuite clivée par l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE) pour produire l'effecteur principal du RAS, l'angiotensine II (ANG II).

1979; Douglas et Hopfer, 1994; Edwards et Aiyar, 1993). Le récepteur AT₁ possède une large distribution. Il est responsable de la plupart des effets biologiques connus de l'Ang II, notamment la vasoconstriction, la sécrétion d'aldostérone et le réabsorption de sodium par les tubules rénaux (Chung et al., 1998; Douglas et Hopfer, 1994; Edwards et Aiyar, 1993). Le récepteur AT₁ (comme le récepteur AT₂) interagit avec des protéines G et active de multiples voies de signalisation intracellulaire dépendant des concentrations d'Ang II et des tissus ciblés. Parmi ces voies se trouvent: l'activation du phosphatidylinositol-biphosphate (PIP₂) via la stimulation de la phospholipase C, l'activation des canaux calciques et l'inhibition de l'activité de l'adénylate cyclase rénaux (Chung et al., 1998; Douglas et Hopfer, 1994; Edwards et Aiyar, 1993). La liaison de l'Ang II au récepteur AT₁ libère la sous-unité α d'une protéine G, ce qui permet à G_q de stimuler la phospholipase C, ou à la sous-unité G_i d'inhiber l'adénylate cyclase. Dans les tubules rénaux, la stimulation du transport tubulaire du sodium passe par l'inhibition de l'adénylate cyclase. Dans les cellules musculaires lisses, l'Ang II active la phospholipase C, ce qui génère l'1,4,5-inositoltriphosphate (IP₃) et le diacylglycérol (DG). Le DG stimule la protéine kinase C, ce qui augmente l'influx de calcium extracellulaire, alors que l'IP₃ permet la relâche du calcium des compartiments intracellulaires. Les cellules musculaires se contractent en réponse à cette augmentation de la concentration du calcium cytoplasmique. D'autres voies de signalisation peuvent également être activées par l'Ang II. À ce jour, la contribution précise de ces différentes voies aux effets de l'Ang II à des doses physiologiques n'est pas élucidée.

Le récepteur AT₂ est largement distribué chez le fœtus, mais chez l'adulte il se trouve principalement dans la médulla de la glande surrénale, l'utérus, les ovaires, dans l'endothélium vasculaire et dans certaines régions du cerveau. Les fonctions précises de ce type de récepteur sont moins connues. Toutefois on suggère qu'il inhiberait la division cellulaire et causerait la vasodilatation (Chung et al., 1998; Edwards et Aiyar, 1993).

1.3.1.3. Régulation de la sécrétion de rénine.

Les prochains paragraphes mettront en lumière la régulation du RAS dont les principaux constituants ont été décrits sommairement au début de la présente section. Le premier

déterminant du degré d'activation du RAS en conditions physiologique est le taux de sécrétion de la rénine. Les mécanismes qui activent la sécrétion de cette carboxypeptidase peuvent être distribués en trois groupes: 1) les récepteurs intrarénaux (barorécepteurs vasculaires et récepteurs de la *macula densa*); 2) les nerfs sympathiques rénaux; et 3) un groupe d'agents humoraux incluant l'oxyde nitrique (NO), les prostaglandines (PGs), l'Ang II et le peptide atrial natriurétique. Les cellules juxtaglomérulaires (JG) du rein (cellules musculaires lisses transformées) constituent la principale cible de ces groupes de stimuli. Elles sont situées principalement dans la média de la région terminale de l'artériole afférente du rein. Il est important de noter que tout stimulus engendrant la diminution du calcium intracellulaire des cellules JG stimulera la relâche de la rénine contenue dans les granules de sécrétion (Hall et Brands, 2000).

1.3.1.3.1. Mécanismes intrarénaux.

Les barorécepteurs rénaux se trouvent dans l'artériole afférente de chaque néphron en association avec les cellules JG. L'augmentation de la pression, détectée par les barorécepteurs, cause l'étirement des cellules JG, ce qui augmente l'influx de calcium dans ces cellules et diminue la sécrétion de rénine (Churchill, 1995; Fray et al., 1987). D'autre part, la *macula densa* sentirait les changements de flux dans les néphrons distaux, en détectant des signaux reliés au transport du chlorure de sodium. De façon générale, la sécrétion de rénine est inversement proportionnelle à la quantité de chlorure de sodium tubulaire de la *macula densa* (Freeman et Davis, 1983; Kojima et al., 1985; Lorenz et al., 1990; Lorenz et al., 1991). Ainsi une diminution du transport du NaCl diminue, il y a relâche de rénine, production d'Ang II, augmentation de la pression sanguine et de la résistance des artéioles afférentes rénales. Ceci permet la diminution du taux de filtration glomérulaire lorsque la pression sanguine est trop basse.

1.3.1.3.2. Nerfs rénaux.

La région juxtaglomérulaire de l'artériole afférente est innervée par des nerfs sympathiques qui stimulent la sécrétion de rénine. L'augmentation de l'activité nerveuse du rein active les récepteurs β -adrénergiques (DiBonna, 1985; Freeman et Davis, 1983; Johns, 1989; Thames, 1978; Thames et DiBonna, 1979; Keeton et Campbell, 1980), ce

qui stimule l'adénylate cyclase des cellules JG causant une diminution du calcium cytoplasmique et la relâche de rénine (Field et al., 1984; Freeman et Davis, 1983). Les nerfs rénaux peuvent également stimuler indirectement la relâche de rénine via les récepteurs α_1 . La stimulation des récepteurs α -adrénergiques augmente la réabsorption de sodium dans les tubules proximaux (DiBonna et Kopp, 1997) et déclenche une vasoconstriction rénale (Johns, 1989). La rénine est ensuite relâchée à cause d'une diminution du transport distal du chlorure de sodium et d'une diminution de la pression de l'artériole afférente.

1.3.1.3.3. Agents humoraux.

L'effet du NO sur la sécrétion de rénine dépendrait de son lieu de synthèse et de relâche, mais les résultats répertoriés à ce jour demeurent contradictoires (Hall et Brands, 2000). Dans le cas des prostaglandines, presque toutes stimulent la sécrétion de rénine (Churchill, 1995; Freeman et Davis, 1983; Freeman et al., 1984; Keeton et Campbell, 1980). Plusieurs mécanismes pourraient être impliqués, par exemple la diminution du calcium cytoplasmique des cellules JG. Pour ce qui est de l'Ang II, elle inhibe la sécrétion de rénine par une boucle de rétroaction négative. Une des voies impliquées dans cette boucle est l'élévation de la pression de perfusion rénale due à l'effet vasopresseur systémique de l'Ang II (Hall et al., 1986; Hall et al., 1986). L'Ang II peut également provoquer la réabsorption du sel et des fluides (Hall, 1986). Cette action ramène le volume du fluide extracellulaire à un niveau suffisant pour réajuster à la normale l'activité du(des) récepteur(s) responsable de l'augmentation initiale de la sécrétion de rénine. Les mécanismes impliqués incluent l'action de l'Ang II sur la réabsorption tubulaire distale et proximale, sur la sécrétion d'aldostérone, et sur le contrôle hémodynamique du rein. Aussi, Une boucle plus courte de rétroaction négative aurait lieu par l'augmentation directe du calcium des cellules JG par l'Ang II (Shade et al., 1973). Finalement, le peptide atrial natriurétique inhibe également la sécrétion de rénine. Ceci pourrait être causé par une interaction entre ce peptide et le barorécepteur vasculaire rénal, la *macula densa*, ou les nerfs rénaux (Harris et al., 1987; Maack et al., 1984; Salazar et al., 1986; Thoren et al., 1986; Villareal et al., 1986).

1.3.1.4. Le RAS dans régulation de la pression et de l'homéostasie des fluides extracellulaires.

La fonction la plus importante du RAS est de maintenir constants le volume des fluides extracellulaires et la pression artérielle, malgré la variation inévitable de la quantité de sel ingurgitée (Fitzsimons, 1980; Hall, 1986; Hall et al., 1995; Laragh et Sealey, 1973; Laragh et Sealey, 1982). De façon résumée, grâce à lui, lorsque le volume extracellulaire augmente, par exemple à cause d'un apport de sel augmenté, le volume du liquide extracellulaire et la pression artérielle grimpent au-dessus de la normale. Cette augmentation cause une diminution de la sécrétion de rénine et de la production d'Ang II. La rétention rénale d'eau et de sel est donc diminuée, le volume extracellulaire réajusté à une valeur près de la normale et la pression sanguine redevient également normale. À l'opposé, quand la pression est sous la normale, il y a une augmentation de la sécrétion de rénine par le rein, production d'Ang II, augmentation de la rétention rénale de sel et d'eau, augmentation du volume et augmentation de la pression.

L'Ang II est le principal effecteur circulant d'une activité rénine plasmatique augmentée. Ce peptide emprunte plusieurs voies pour augmenter la pression artérielle. Son effet le plus direct est la vasoconstriction, qui se produit rapidement. Elle augmente la résistance périphérique totale, faisant ainsi grimper la pression artérielle (Chung et al., 1998; Douglas et Hopfer, 1994; Edwards et Aiyar, 1993).

L'Ang II peut également augmenter la pression artérielle par ses effets sur le rein. L'Ang II est une des hormones les plus puissantes pour la rétention du sodium dans le corps. L'effet antinatriurétique de l'Ang II serait du principalement à la stimulation de la réabsorption tubulaire du sodium et d'eau (Hall, 1986). Deux effets de l'Ang II sur le rein seraient impliqués. Le premier résulte de l'action directe de l'Ang II sur le rein, qui cause une vasoconstriction rénale, ce qui diminue le flux sanguin dans le rein. Ainsi moins de liquide filtre à travers le glomérule vers la lumière de tubules. Aussi, la réduction du flux sanguin dans les capillaires réduit leur pression, ce qui permet une réabsorption osmotique rapide du fluide des tubules. La diminution de l'excrétion ou l'augmentation de la réabsorption contribuent à diminuer la quantité d'urine excrétée. Le second

mécanisme intrarénal est l'action de l'Ang II sur les cellules tubulaires, mais cet effet contribue plus faiblement que la vasoconstriction rénale au contrôle de la réabsorption de liquide et de sel (Hall, 1986).

De façon indirecte et en moindre proportion, l'Ang II augmenterait la réabsorption de sodium en stimulant la production d'aldostérone et en activant le nerf sympathique rénal (Hall, 1986). L'Ang II est le régulateur physiologique majeur de la sécrétion d'aldostérone (Davis, 1975; Laragh et Sealey, 1973). L'hormone adrénocorticotrope (ACTH) et le potassium stimulent également la production d'aldostérone, alors que le peptide atrial natriurétique l'inhibe (Davis, 1975; Quinn et William, 1988). L'aldostérone jouerait cependant un rôle plus important dans la régulation de la balance du potassium intracellulaire versus extracellulaire que dans celle du sodium (Hall et Brands, 2000).

Les effets rénaux de l'Ang II combinés à son effet activateur sur la sécrétion d'aldostérone engendrent en quelques heures voire quelques jours une élévation de la pression artérielle. Cet effet à long terme est plus important que la vasoconstriction systémique induite par l'Ang II dans la restauration éventuelle d'une pression artérielle normale (Hall et Brands, 2000).

1.3.1.5. Le système nerveux central dans la régulation de la pression et de l'homéostasie des fluides extracellulaires.

Le système nerveux central participe également à la régulation du volume des fluides extracellulaires. Lorsque les osmorécepteurs de l'hypothalamus détectent une osmolarité des fluides corporels dépassant la normale, l'hypophyse postérieure relâche l'hormone antidiurétique (ADH) synthétisée par l'hypothalamus, ce qui augmente la perméabilité à l'eau des tubules distaux et des tubules collecteurs. Il y a donc augmentation de la quantité d'eau réabsorbée, sans que l'excrétion des solutés ne soit affectée. Cette indépendance de la régulation de la sécrétion des solutés et de l'eau devient particulièrement importante quand la prise de liquide est limitée (Hall et Brands, 2000).

À l'opposé, quand l'osmolarité des fluides extracellulaires diminue, la sécrétion d'ADH par l'hypophyse est réduite, la perméabilité à l'eau des tubules distaux et collecteurs diminue, causant ainsi l'excrétion d'une quantité importante d'urine diluée.

Malgré tous les mécanismes énumérés permettant de contrôler l'osmolarité et le volume des fluides extracellulaires, la prise de liquide est essentielle pour contrebalancer les pertes de fluides par transpiration, respiration, et par le conduit gastro-intestinal. La prise d'eau est contrôlée par le mécanisme de la soif. Plusieurs des stimuli contrôlant la sécrétion d'ADH agissent également sur la soif. Le centre de la soif est situé dans l'hypothalamus. Une augmentation de l'osmolarité du fluide cérébro-spinal du troisième ventricule stimule la soif. La diminution du volume du fluide extracellulaire ou de la pression sanguine la stimule également mais par une voie indépendante.

Un troisième stimulus très important de la soif est l'Ang II (Fitzsimons, 1998). Des études avec des modèles animaux ont démontré son action sur l'organe subfornical, *l'organum vasculosum* et la *lamina terminalis*, régions du cerveau situées à l'extérieur de la barrière hémato-encéphalique. L'Ang II peut donc y diffuser. L'Ang II agit également sur l'appétit pour le sel (Fitzsimons, 1998). Lorsqu'il y a baisse de pression, l'effet de l'Ang II sur la soif et l'appétit pour le sel, en conjonction avec ses actions sur le rein, permet de restaurer la pression et le volume sanguin à des valeurs normales.

1.3.1.6. Le RAS et l'hypertension artérielle.

Il est clair que le RAS est un des plus puissants régulateurs de la pression artérielle du corps. Dans la plupart des cas, l'activation du RAS a pour objet de compenser pour une perte de volume ou une baisse de pression et pour la diminution de la perfusion des reins. Les reins répondent en augmentant la sécrétion de rénine et la formation d'Ang II, augmentant ainsi la rétention de sodium et d'eau, la soif, une vasoconstriction périphérique et une diminution de la capacitance vasculaire. Tous ces effets de l'Ang II aident à rétablir à la normale le volume des fluides corporels et la pression de perfusion des reins. Cependant, plusieurs conditions physiopathologiques peuvent conduire à l'hypertension. Ce processus multifactoriel implique une interaction entre des facteurs

environnementaux et génétiques. À différents degrés, l'hypertension résulte d'anomalies dans la régulation du volume sanguin, d'une vasoconstriction augmentée, et du remodelage de la paroi artérielle. Ses causes exactes sont par contre inconnues dans 90 pour cent des cas (Hall et Brands, 2000).

1.3.2. Les systèmes rénine-angiotensine tissulaires.

Durant les deux dernières décennies, il a été mis en évidence qu'un nombre important de tissus possédaient toutes les composantes du RAS, notamment le cœur, le rein, la glande surrénale, le cerveau et les vaisseaux sanguins (Campbell, 1987; Dzau, 1988; Unger et al., 1991). Ces découvertes ont ouvert la porte à plusieurs hypothèses selon lesquelles l'Ang II pourrait avoir des effets autres que ses rôles classiques de régulation de la pression sanguine et de maintien de l'homéostasie des fluides et de l'osmolarité.

1.4. Relations entre le RAS et l'athérosclérose.

Plusieurs données suggèrent l'implication du RAS dans l'athérogénèse (Griendling et Alexander, 1997; Griendling et al., 1997). Encore aujourd'hui, la question persiste à savoir si l'hypertension contribue à l'athérosclérose ou si le peptide effecteur du RAS, l'Ang II, a un rôle direct et indépendant de son effet vasopresseur dans cette pathologie (Figure 1.3). La section suivante fait état des différentes études allant dans un sens et dans l'autre.

1.4.1. Rôle de l'hypertension dans l'athérogénèse.

Selon plusieurs études cliniques, l'hypertension augmenterait la risque de développer l'athérosclérose (Stamler et al., 1989; Kannel et al., 1986). Des expériences utilisant des lapins Watanabe (héréditairement hypercholestérolémiques) ont révélé une synergie dans le développement de l'athérosclérose lorsque l'hypertension accompagnait l'hyperlipidémie (Chobanian et al., 1989). Ainsi, des études cliniques et des études utilisant des modèles animaux suggèrent que l'hypertension contribue au développement de l'athérosclérose. Aussi, les lésions se trouvent généralement dans les régions des artères qui sont soumises à une plus haute pression. Les hypothèses actuelles sur le mécanisme impliqué font référence à une augmentation non-uniforme du stress

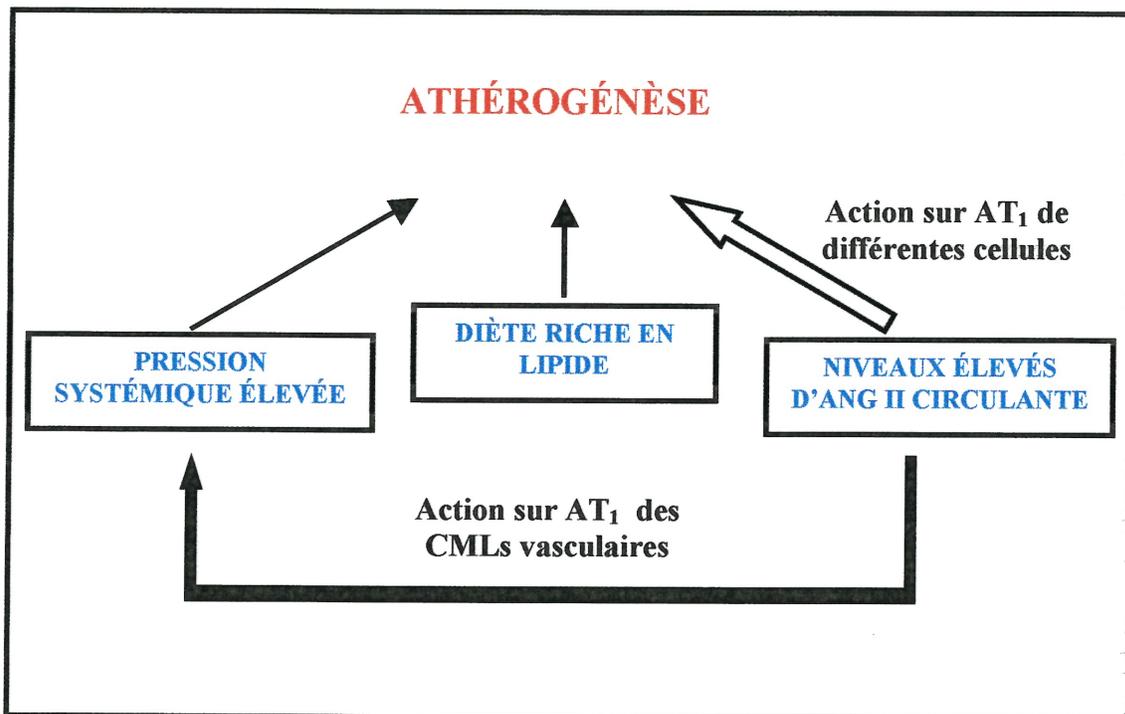


Figure 1.3 : Relations entre l'Ang II, l'hypertension et l'athérogénèse. L'angiotensine II (Ang II) pourrait influencer l'athérogénèse directement ou indirectement par son rôle vasopresseur. CML : cellules musculaires lisses. AT₁ : récepteurs de l'angiotensine II de type 1.

mécanique subi par la paroi (Thubrikar et al., 1990; Thubrikar et al., 1994). Cette élévation du stress mécanique vasculaire a été proposée comme stimulus proinflammatoire (Taylor, 1998), tel que mis en évidence par l'association entre les forces mécaniques, la génération de spécimens réactifs de l'oxygène (Howard et al., 1997; Hishikawa et al., 1997), et l'expression de gènes proinflammatoires (Wung et al., 1997; Wang et al., 1995; Capers et al., 1997). De plus, une association a été établie entre la diminution du stress mécanique de la paroi et la diminution de l'athérosclérose chez le lapin (Thubrikar et al., 1988). Une étude comparant le blocage des récepteurs AT₁ par l'Irbesartan et l'inhibition de l'ACE par différents inhibiteurs chez le lapin Watanabe héréditairement hypercholestérolémique démontre que ces deux classes d'agents permettent une réduction de l'athérosclérose seulement quand les doses utilisées réduisent la pression sanguine (Hope et al., 1999).

Malgré tous les facteurs qui suggèrent une association entre l'hypertension et l'athérosclérose, plusieurs doutes persistent. D'abord, l'incapacité à réduire les risques de complications athérosclérotiques coronaires par l'utilisation de médicaments réduisant la pression suggère que pour certains patients, l'hypertension ne serait pas la cause de l'athérosclérose (Bondjers et al., 1991). De plus, chez la souris apoE^{-/-}, l'hypertension induite par Ang II augmente l'athérosclérose dramatiquement, alors qu'une augmentation très légère est observée lorsque l'hypertension est causée par la norépinéphrine (Weiss et al., 2001). Ceci suggère que l'hypertension à elle seule n'est peut-être pas responsable de l'augmentation de l'athérosclérose.

D'autres études se sont donc tournées vers l'identification d'autres causes pouvant entraîner la suite de réactions inflammatoires décrites dans les sections précédentes.

1.4.2. Effets de l'Ang II sur différentes cellules impliquées dans la formation des lésions.

Plusieurs études ont tenté de déterminer de façon plus précise le rôle joué par l'Ang II dans le processus athérosclérotique. De toute évidence, l'Ang II peut être responsable de l'hypertension, qui à son tour contribue au développement et à la progression des lésions.

Mais qu'en est-il de l'effet de l'Ang II sur les cellules et les molécules qui contribuent à l'athérogénèse chez les modèles animaux ? Or, un nombre croissant d'études imputent à l'Ang II un rôle important dans la régulation de l'expression et/ou de l'activité des molécules qui contribuent à l'initiation et au développement des lésions. Aussi, un nombre croissant d'indices suggère que l'Ang II ne proviendrait pas nécessairement d'une relâche massive dans la circulation, mais pourrait être générée localement dans la paroi artérielle, ce qui rend possible un effet direct de l'Ang II sur l'athérogénèse sans augmentation de la pression systémique. La fin de cette section relate les résultats de quelques études qui tracent la voie vers un rôle direct ou vers un rôle indirect de l'Ang II dans l'athérogénèse, et les limites reliées à ces résultats.

En ce qui concerne les différentes composantes du RAS tissulaire, elles ont été détectées dans les plaques d'athérosclérose chez l'humain et chez les modèles animaux. D'abord, l'ACE et l'Ang II ont été détectées dans les parois des artères coronaires athérosclérotiques (Diet et al., 1996). Plus précisément, l'ACE est exprimée sur les macrophages et les cellules endothéliales des lésions de la carotide chez l'humain (Fukuhara et al., 2000). Les récepteurs AT₁ sont présents sur les macrophages en culture (Scheidegger et al., 1997). Les monocytes (Shimada et Yazaki, 1978) et les cellules endothéliales humaines de l'artère coronaire (HCAECs) (Li et al., 1999) possèdent également des récepteurs pour l'Ang II (AT₁>AT₂). Ainsi, il est possible qu'une génération locale d'Ang II existe au sein des lésions, et que l'Ang II générée localement agissent sur les cellules qui la composent. Aussi, il est important de noter que de hauts niveaux de LDL, condition physiologique souvent observée chez des sujets athérosclérotiques, stimulent l'expression du récepteur AT₁ sur les cellules musculaires lisses vasculaires, ce qui souligne l'importance de l'action de l'Ang II sur ces cellules dans l'athérogénèse (Nickenig et Harrison, 2002).

En observant les résultats obtenus *in vitro*, il devient évident que l'Ang II peut exercer des effets multiples sur les cellules impliquées dans la formation des lésions, engendrant des réactions cellulaires athérogéniques. Cependant, lorsqu'il s'agit d'attribuer à l'Ang II

un rôle direct dans la formation des lésions *in vivo*, plusieurs limites reliées aux modèles expérimentaux utilisés rendent difficile l'établissement de conclusions non équivoques.

1.4.2.1. Études réalisées *in vitro*.

L'effet de l'Ang II sur le stress oxydatif subendothélial et la capture de particules oxydées par certaines cellules a été proposé par différents résultats. Certaines études ont démontré que l'Ang II cause l'augmentation de l'expression et de l'activité de la lipoxigénase des macrophages par les récepteurs AT₁ (Scheidegger et al., 1997). Ceci entraîne une oxydation accrue des LDLs dans la paroi artérielle. Comme il a été discuté précédemment, le stress oxydatif qui résulte de l'accumulation de LDLs oxydés peut accroître le recrutement de monocytes dans la paroi et aggraver l'athérogénèse. D'autres expériences démontrent que les cellules endothéliales humaines de l'artère coronaire (HCAECs) expriment un récepteur pour les LDLox (LOX-1) et les récepteurs pour l'Ang II (AT₁>AT₂) (Li et al., 1999). Lorsque l'Ang II est administré aux HCAECs, l'expression de LOX-1 augmente au niveau de l'ARNm et de la protéine, et ce de manière dose-dépendante. L'action de l'Ang II sur ces cellules stimulerait également la capture des LDLox par celles-ci. Comme ces effets sont complètement inhibés par un prétraitement au Losartan, il est possible d'affirmer que les récepteurs AT₁ sont impliqués. L'Ang II augmente également les dommages causés aux HCAECs (Li et al., 1999). De plus, dans les cellules musculaires lisses vasculaires humaines en culture, l'Ang II stimule la production de superoxydes par la phospholipase D (Touyz et Schiffrin, 1999), ce qui pourrait augmenter le stress oxydatif vasculaire.

Aussi, l'Ang II augmenterait l'expression de plusieurs molécules impliquées dans l'adhésion cellulaire et la chémotaxie. Entre autres, MCP-1 voit son expression augmentée par l'Ang II via les récepteurs AT₁ et la voie de la Rho-Kinase dans les cellules musculaires lisses chez le rat (Funakoshi et al., 2001).

Ces études réalisées *in vitro* apportent certainement des indices importants quant aux mécanismes susceptibles de contribuer à l'athérogénèse. Elles ne prouvent cependant pas

que ces mécanismes se produisent *in vivo* en réponse à une stimulation directe des récepteurs AT₁ des cellules dont il est question.

1.4.2.2. Études réalisées *in vivo*.

En ce qui concerne l'expérimentation *in vivo*, plusieurs modèles animaux d'athérosclérose ont été développés et sont utilisés couramment. Par exemple, la souris apoE^{-/-} développe une athérosclérose sévère et en plusieurs points comparables à celle observée chez l'humain, lorsqu'on la soumet à un régime à haute teneur en lipides. Plusieurs expériences ont été réalisées grâce à ce modèle. Par exemple, une injection intrapéritonéale d'Ang II augmente la capture de LDLs par les macrophages péritonéaux. Aussi, lorsqu'on induit à la souris apoE^{-/-} une hypertension par une administration systémique d'Ang II, son athérosclérose augmente dramatiquement, alors qu'une augmentation légère est observée lorsque l'hypertension est causée par la norépinéphrine (Weiss et al., 2001). Cette étude présente cependant une limite quant à l'évaluation du rôle direct de l'Ang II dans l'athérogénèse, puisqu'elle ne démontre pas l'effet de l'Ang II en absence d'hypertension.

Dans une expérience semblable chez le rat, l'hypertension médiée par l'Ang II, mais pas celle engendrée par la norépinéphrine, cause une augmentation de la production de radicaux libres de l'oxygène par les cellules musculaires lisses, via une activation de la NADH/NADPH oxydase membranaire. Cette activation et cette production de radicaux sont inhibées par le Losartan, suggérant que les récepteurs AT₁ sont impliqués (Rajagopalan et al., 1996). Encore une fois, cette étude ne prouve pas que l'Ang II agit seule, sans hypertension, sur l'athérogénèse. Aussi, l'effet du Losartan dans ce système pourrait découler de sa capacité à diminuer la pression sanguine.

Toujours chez le rat, l'Ang II augmente l'expression de la molécule VCAM-1 sur les cellules musculaires lisses vasculaires par l'activation de la liaison à l'ADN de NF- κ B (Tummala et al., 1999) et de MCP-1 sur les cellules musculaires lisses vasculaires par les récepteurs AT₁ via la voie des MAP kinases (Chen et al., 1998). L'Ang II induit également une interaction entre les leucocytes et les cellules endothéliales en augmentant

l'expression de la P-sélectine via les récepteurs AT₁ et AT₂ (Piqueras et al., 2000). Encore une fois, l'administration systémique d'Ang II engendre une hausse de la pression, ce qui empêche de dresser des conclusions concernant la contribution de l'Ang II.

1.4.2.3.Effet de l'inhibition de l'ACE sur le développement des lésions.

Parmi les stratégies développées en vue de réduire le développement de l'athérosclérose et l'incidence des pathologies qui en découlent, les inhibiteurs de l'ACE ont succédé aux statines. En effet, l'inhibition de l'ACE réduit la progression des lésions dans plusieurs modèles animaux d'athérosclérose (Hope et al., 1999; Chobanian et al., 1992; Aberg et Ferrer, 1990; Kowala et al., 1994; Schuh et al., 1993). Cette section fait état de différentes études ayant mené à cette conclusion.

Chez le lapin héréditairement hyperlipidémique Watanabe normotendu, l'inhibition de l'ACE par le Captopril, l'athérosclérose est diminuée (Chobanian et al., 1990). Dans le même ordre d'idées, chez la souris apoE -/-, l'inhibition de l'ACE par le Captopril réduit le développement des lésions et l'oxydation des LDLs (Hayek et al., 1998). Le Captopril a également été utilisé chez le singe *cynomolgus*, et il diminuait la taille des lésions (Aberg et Ferrer, 1990). Ces résultats apportent des réponses très intéressantes quant à une cible potentielle pour le traitement de l'athérosclérose. Ils présentent cependant la limite suivante si leur but est de discerner les effets directs de l'Ang II dans l'athérogénèse : le Captopril diminue la pression sanguine sous la normale par rapport aux animaux contrôles. Le Trandolapril, un autre inhibiteur de l'ACE, inhibe l'athérosclérose chez le lapin Watanabe (Chobanian et al., 1992). La pression est également légèrement diminuée par rapport à la normale avec cet inhibiteur.

1.4.2.4.Effet du blocage des récepteurs AT₁ sur le développement des lésions.

L'ACE ne serait pas la seule enzyme à pouvoir générer de l'Ang II à partir de l'Ang I. En effet, la chymase possède également cette capacité (Okunishi et al., 1987; Husain, 1993). D'autres cibles ont donc été visées dans le but d'inhiber le RAS: les récepteurs de l'Ang II. Les effets de plusieurs agents capables de bloquer sélectivement les récepteurs AT₁ ont

été évalués quant à leur capacité à réduire l'athérosclérose. Sont répertoriées dans cette section les principales études ainsi que les limites associées à celles-ci.

Le blocage des récepteurs AT₁ influence plusieurs processus potentiellement impliqués dans le développement des lésions. Il inhibe l'activation des monocytes (Strawn et al., 1999), l'oxydation des LDLs (Keidar et al., 1997b; Strawn et al., 2000), l'initiation des lésions (Hope et al., 1999; Strawn et al., 2000) et le développement des lésions (Makaritsis et al., 1998; Schuh et al., 1993).

Plusieurs modèles animaux ont été utilisés dans le but d'étudier la progression des lésions chez des animaux traités par rapport à des animaux contrôle. Chez le singe *cynomolgus* avec une hypercholestérolémie induite par la diète, le blocage des récepteurs AT₁ avec du Losartan permet une diminution de l'athérogénèse (Aberg et Ferrer, 1990). Le blocage des récepteurs AT₁ par l'Irbesartan chez la souris apoE^{-/-} diminue la taille des lésions, l'expression des chémokines, et l'accumulation de macrophages (Dol et al., 2001). Chez le lapin avec une hypercholestérolémie induite par la diète, les expressions de la sélectine P et de MCP-1, molécules impliquées dans les interactions cellulaires, sont diminuées par le Losartan (Chen et al., 2001). Ce résultat va dans le même sens que celui des expériences dans lesquelles la délétion de l'un ou l'autre de ces gènes entraîne une diminution de l'athérosclérose chez la souris apoE^{-/-} (Collins et al., 2000), suggérant leur implication dans l'athérogénèse. Finalement, le Losartan inhibe la peroxydation des LDLs et l'athérosclérose chez la souris apoE^{-/-} (Keidar et al., 1997a). Un autre antagoniste, l'Irbesartan, réduit l'expression de MCP-1 dans les lésions (Dol et al., 2001). Le principal problème relié à ces études est que l'utilisation d'une drogue de façon systémique peut causer une diminution de pression minime, et que l'effet observé peut être une conséquence de la baisse de pression. D'ailleurs, la pression systémique n'est même pas mesurée dans certaines de ces études, et elle subit effectivement une baisse dans d'autres.

1.5. Limitations des résultats actuels: les conclusions ne sont pas les mêmes pour tous les modèles d'athérosclérose étudiés.

Se basant sur les résultats mentionnés, il devient évident que l'Ang II affecte *in vitro* plusieurs processus potentiellement athérogéniques. Cependant, il est également évident qu'une controverse majeure persiste quant à l'attribution d'un rôle direct à l'Ang II dans le développement de l'athérosclérose *in vivo*. (Il est important de mentionner que le rôle direct de l'Ang II, dans le présent projet de recherche, fait référence à une action du peptide qui est indépendante de ses effets systémiques reliés au contrôle de la pression et de l'homéostasie des fluides extracellulaires.) Certains modèles montrent que l'administration systémique d'Ang II contribue à la formation de plaques. Or, une administration systémique engendre dans la plupart des études réalisées une légère augmentation de la pression sanguine, ce qui rend difficile la tâche de discerner les effets directs de l'Ang II sur les cellules impliquées dans la formation des lésions, de ses effets reliés à son action vasopressive. D'autres études font appel à un blocage de l'ACE ou des récepteurs AT₁ chez des animaux normotendus athérosclérotiques. L'utilisation de ces agents, dans bien des cas, cause une diminution sous la normale de la pression des animaux traités. D'autant plus que, chez le lapin Watanabe, les lésions régressent seulement lorsque les doses d'inhibiteurs de l'ACE ou de bloqueurs AT₁ engendrent une diminution de la pression systémique. Vu les résultats quelque peu équivoques, il sera nécessaire de poursuivre le développement de modèles animaux permettant d'évaluer le rôle de l'Ang II dans l'athérogénèse, dans lesquels la circulation systémique ne sera pas soumise à une libération massive d'Ang II. Le présent projet de recherche propose un complément intéressant aux recherches dans ce domaine. Il propose le développement d'un modèle animal qui procurera l'avantage de permettre une libération locale d'Ang II dans l'espace subendothélial.

1.6. Hypothèse de travail.

L'Ang II, par son effet direct indépendant de son rôle vasopresseur, rendrait les macrophages plus invasifs *in vivo*.

1.7. Projet de recherche.

Puisque le présent projet de recherche vise la vérification du rôle direct de l'Ang II sur le comportement invasif des macrophages *in vivo*, des souris transgéniques dont les macrophages peuvent libérer ce peptide ont été produites. Ces macrophages transgéniques serviront de véhicule pour une libération locale d'Ang II dans l'espace subendothélial, et le peptide pourra agir de façon autocrine ou paracrine sur les cellules de la paroi vasculaire. Le comportement invasif des macrophages sera mesuré chez ces animaux par rapport à des animaux contrôle. Ce modèle pourrait mimer un RAS tissulaire activé, permettant d'évaluer les effets directs de l'Ang II, indépendant de son effet vasopresseur, sur le comportement invasif des macrophages. Comme la biosynthèse de l'Ang II implique l'action de plusieurs protéines codées par différents gènes (Figure 1.2), une protéine de fusion développée dans le laboratoire sera utilisée afin de cibler la relâche d'Ang II aux macrophages. Cette protéine, lorsqu'elle est clivée par la furine, libère le peptide Ang II.

Plusieurs étapes doivent être franchies afin de vérifier l'hypothèse. D'abord, il est essentiel de vérifier la présence de la furine dans les macrophages et son efficacité à cliver le site furine d'une protéine de fusion (Methot et al., 1997). Il est également nécessaire de choisir des régions promotrices permettant de diriger l'expression aux macrophages chez la souris. Par la suite, des constructions d'ADN permettant l'expression de la protéine de fusion conduisant à la relâche d'Ang II sous la dépendance d'un promoteur macrophage spécifique doivent être générées. Des souris transgéniques doivent être produites et croisées avec des souris C57BL/6. Les lignées doivent être suivies par *Southern Blot*. L'expression du transgène par les macrophages doit être vérifiée, ainsi que la libération de l'Ang II par ces derniers. La spécificité des promoteurs utilisés doit également être déterminée. Il faudra de toute évidence obtenir des lignées dont la pression artérielle ne sera pas affectée par l'Ang II provenant des macrophages. Aussi, un protocole doit être développé afin de vérifier si les macrophages transgéniques sont plus invasifs que les macrophages de type sauvage.

2. CHAPITRE II : MATÉRIEL ET MÉTHODES

La Figure 2.1 représente schématiquement l'approche expérimentale utilisée pour l'ensemble du projet.

2.1. Matériel

Liste des produits chimiques :

Acide chlorhydrique	Anachemia, Lachine, Québec
Acide- <i>ortho</i> -phosphorique	Fisher Scientific, Nepean, Ontario
Acrylamide	Bio Basic, Murrieta, CA
Agarose	Hoffman-La Roche, Missasauga, Ontario
Azote liquide	Praxair Canada, Missasauga, Ontario
Bicarbonate de sodium	Anachemia, Lachine, Québec
Bleu de bromophénol	Bio Rad Laboratories, Missasauga, Ontario
Bromure d'éthydiu	Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario
<i>Calf intestinal alkaline phosphatase</i>	Amersham Biosciences, B. d'Urfée, Québec
Chlorure de sodium	Anachemia, Lachine, Québec
Citrate de sodium	Anachemia, Lachine, Québec
Colonnes C18 <i>Sep-Pak</i>	Waters Ltée, Dorval, Québec
Acétate de Sodium	Anachemia, Lachine, Québec
<i>Denharts reagent</i>	Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario
DTT	VWR Canlab, Missasauga, Ontario
EDTA	Fisher Scientific, Nepean, Ontario
Éthanol	Anachemia, Lachine, Québec
Films et écran intensificateur Kodak	
Biomax MS	Life Sciences, Woodbridge, Ontario
Formaldéhyde	Anachemia, Lachine, Québec
Formamide	Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario
Isopropanol	Anachemia, Lachine, Québec
Chlorure de Lithium	Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario
Méthanol	Anachemia, Lachine, Québec
MOPS	Hoffman-La Roche, Missasauga, Ontario
Papier Whatman 3MM	Anachemia, Lachine, Québec
Phenylmethylsulfonyl fluoride	Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario
Phosphate de sodium	Anachemia, Lachine, Québec
Polyéthylène glycol	Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario
Sodium dodécyl sulfate	Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario
Tris-HCl	Invitrogen, Oakville, Ontario
Xylène cyanol	Amersham Biosciences, B. d'Urfée, Québec
β -mercaptoéthanol	Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario

Figure 2.1: Représentation schématique de l'approche expérimentale utilisée. Par transfection (T°) avec des protéines de fusion dotées de sites furine, la présence de furine dans les macrophages (ϕ) est vérifiée en dosant les produits de clivage par RIA. Le gène F4/80 exprimé spécifiquement dans les macrophages a été cloné et utilisé pour une RNase protection visant la quantification des macrophages dans les tissus. Une protéine de fusion permettant la relâche d'Ang II a été mise sous le contrôle de deux promoteurs différents pour la transgénèse: SR-A pour l'expression dans les macrophages et gp91-PHOX pour l'expression dans les macrophages et les monocytes. Les transgéniques ont été identifiées par PCR et croisées avec des C57BL/6. Parmi la F1, des animaux ont été sacrifiés pour la vérification de l'expression du transgène par les macrophages au niveau de l'ARNm et de la protéine. L'ADN de souris dont les macrophages exprimaient l'Ang II a été utilisé pour un *Southern blot* pour comparer les patrons avec les reproducteurs potentiels et croiser seulement les animaux avec le même patron pour les générations subséquentes. Une RNase protection a également été effectuée sur les tissus pour vérifier la spécificité des promoteurs. Finalement, le comportement invasif des macrophages des animaux transgéniques versus non-transgéniques a été évalué grâce à une RNase protection macrophage-spécifique utilisant F4/80 comme sonde.

Liste des produits de biologie moléculaire et culture cellulaire:

ADN de sperme de saumon	Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario
Ampicilline (Amp)	Hoffman-La Roche, Missasauga, Ontario
Anticorps anti IgG polyclonal lapin	BD Biosciences, Missasauga, Ontario
ARNt de levure	Invotrogen, Burlington, Ontario
BamHI	Amersham Biosciences, B. d'Urfée, Québec
Concert pour large prep et mini-prep	Invotrogen, Burlington, Ontario
DEAE-Dextran	Amersham Biosciences, B. d'Urfée, Québec
Dulbecco's modified eagle medium	Invotrogen, Burlington, Ontario
Sérum de veau fétal	Bio Media Canada Inc.
Formamide désionisée	Invotrogen, Burlington, Ontario
Gentamycine	Invotrogen, Burlington, Ontario
HindIII	Amersham Biosciences, B. d'Urfée, Québec
<i>Klenow</i>	Invitrogen, Burlington, Ontario
KpnI	Amersham Biosciences, B. d'Urfée, Québec
Membrane <i>genescreen plus</i>	NEN/Perkin Elmer, Woodbridge, Ontario
Sérum de lapin normal	Bio Media Canada, Drummondville, Québec
NotI	Amersham Biosciences, B. d'Urfée, Québec
<i>Onephorall buffer</i>	Amersham Biosciences, B. d'Urfée, Québec
phénol-chloroforme	Invotrogen, Burlington, Ontario
Phosphorimager	Amersham Biosciences, B. d'Urfée, Québec
Polymérase T3 et T7	VWR Canlab, Missasauga, Ontario
Polynucléotides kinase	Amersham Biosciences, B. d'Urfée, Québec
Protéase de <i>Streptomyces griseus</i>	Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario
Protéinase K	Hoffman-La Roche, Missasauga, Ontario
PvuII	Amersham Biosciences, B. d'Urfée, Québec
Pwo polymérase	Hoffman-La Roche, Missasauga, Ontario
<i>Random primers DNA labelling system</i>	Invotrogen, Burlington, Ontario
rATP	VWR Canlab, Missasauga, Ontario
rCTP	VWR Canlab, Missasauga, Ontario
rGTP	VWR Canlab, Missasauga, Ontario
<i>RNAguard</i>	VWR Canlab, Missasauga, Ontario
RNAse A	Invotrogen, Burlington, Ontario
RNAse T1	Invotrogen, Burlington, Ontario
<i>DNAse RQ1 sans RNAse</i>	VWR Canlab, Missasauga, Ontario
rUTP	VWR Canlab, Missasauga, Ontario
Séquenceur Ceq 2000XL	Beckman Coulter, Missasauga, Ontario
<i>Speed Vac concentrater</i>	Global Medical Instrumentation, Clearwater, Ontario
Substrat de mouton	Bio Media Canada, Drummondville, Québec
T4 ADN ligase	Amersham Biosciences, B. d'Urfée, Québec
Trypsine-EDTA	Invotrogen, Burlington, Ontario
Tampon d'activation à la trypsine	Invotrogen, Burlington, Ontario
XbaI	Amersham Biosciences, B. d'Urfée, Québec
XhoI	Amersham Biosciences, B. d'Urfée, Québec
T3 ARN polymérase	VWR Canlab, Missasauga, Ontario

T7 ARN polymérase	VWR Canlab, Mississauga, Ontario
Thioglycollate	BD Biosciences, Mississauga, Ontario
Tampon de transcription	VWR Canlab, Mississauga, Ontario
[α - 32 P] dCTP	Amersham Biosciences, B. d'Urfée, Québec
[α - 32 P]-CTP	Amersham Biosciences, B. d'Urfée, Québec
[γ - 32 P]-ATP	Amersham Biosciences, B. d'Urfée, Québec

Solutions utilisées :

<u>Tampon de chargement :</u>	80% formamide désionisée 10 mM EDTA 1 mg/ml Xylène cyanol 1 mg/ml bleu de bromophénol
<u>10X MSB :</u>	0,75 M NaCl 0,1 M Tris-HCl pH 7,5 0,1 M MgCl ₂ 10 mM DTT
<u>PBS 1X pH 7,2 :</u>	0,01 M phosphate de sodium 0,15 M NaCl
<u>Solution dénaturante :</u>	4 M guanidine isothiocyanate 25 mM Sodium citrate 0,5% sarkosyl 90 mM β -mercaptoéthanol
<u>Solution d'hybridation :</u>	6X SSC 0,5% SDS 100 μ g/ml d'ADN de sperme de saumon 50% formamide désionisée
<u>Solution de préhybridation :</u>	6X SSC 5X Denharts reagent 0,5% SDS 100 μ g/ml d'ADN de sperme de saumon 50% formamide désionisée
<u>Solution de RNAses :</u>	10 mM Tris-HCl pH 8,0 5 mM EDTA pH 8,0 300 mM NaCl 30 U/ml RNase T1 40 μ g/ml RNase A
<u>Tampon acide malique + 8-OH :</u>	0,2 M acide malique pH 6,5

	8-Hydroxyquinolone 13,8%
<u>Tampon d'hybridation 80% formamide:</u>	80% formamide désionisée 40 mM PIPES 0,4 M NaCl 1 mM EDTA
<u>Tampon Ang I :</u>	0,1 M phosphate de potassium pH 7,4 0,25% BSA 0,02% NaN ₃ 3 mM EDTA
<u>Tampon Ang I + 8-OH :</u>	Tampon Ang I + 0,03% de 8-Hydroxyquinoline
<u>Tampon de digestion de queues de souris:</u>	50 mM Tris-HCl 100 mM EDTA pH 8,0 0,5% SDS 0,2 M NaCl

2.2. Vérification de la présence de furine dans les macrophages.

Des cellules j774 cultivées dans du DMEM avec 10% FCS + Gentamycine 10 µg/ml ont été transfectées avec deux différents plasmides. Le premier permet aux cellules d'exprimer la protéine de fusion de la figure 2.2. L'Ang II produite par le clivage de la protéine de fusion a été quantifiée dans le surnageant par RIA avec des anticorps anti-Ang II polyclonaux produits chez le lapin. Le second plasmide conduit à l'expression de la protéine illustrée à la figure 2.3. La rénine produite par ces cellules était mesurée par un essai enzymatique avec l'angiotensinogène et un RIA qui mesure l'Ang I produite lors de la réaction. Cette seconde méthode permettait une plus grande sensibilité grâce à l'étape enzymatique.

Les cellules j774 ont été étalées dans des plaques de 12 puits de façon à obtenir 80 000 cellules / puit. Elles ont été lavées deux fois avec du DMEM sans sérum. Elles ont été transfectées avec un mélange contenant 2,5 µg/ml d'ADN plasmidique et 40 µg/ml de DEAE-Dextran dans du DMEM sans sérum. Les cellules ont été mises à l'incubateur à 5% de CO₂ et à 37°C pour une heure, après quoi le milieu de transfection a été remplacé par du milieu complet (DMEM avec 10% FCS + Gentamycine 10 µg/ml) pour une incubation de 28 heures dans les mêmes conditions. Pour la transfection avec la protéine de la figure 2.2, les cellules et les surnageants ont ensuite été traités pour leur utilisation dans un RIA. Pour la protéine de la figure 2.3, des échantillons de surnageants ont été utilisés directement pour un essai enzymatique avec l'angiotensinogène.

2.2.1. Traitement des cellules et des surnageants pour RIA.

Les surnageants étaient retirés des cellules 28 heures après transfection et transférés dans des tubes de culture froids avec EDTA en concentration finale de 10 mM. Les cellules étaient trypsinisées avec 2 ml de trypsine-EDTA 10 mg/ml et 2 ml de DMEM complet étaient ajoutés pour arrêter la réaction.

2.2.2. Préparation des surnageants.

Les surnageants contenant l'EDTA 10mM étaient bouillis 5 minutes pour dénaturer les protéines. Ils étaient ensuite centrifugés 10 minutes à 4°C à 15 000g. Une solution d'acide

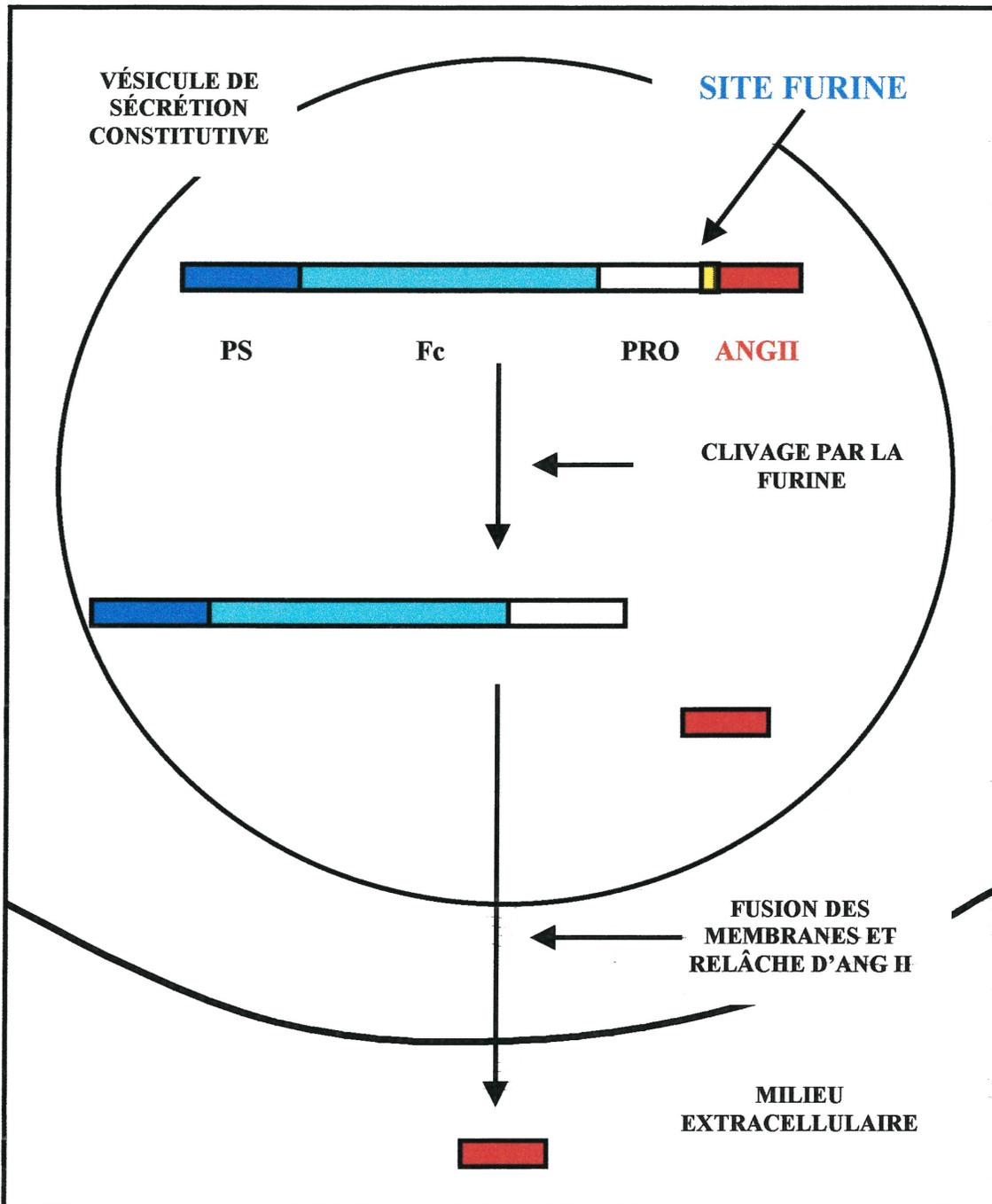


Figure 2.2 : Représentation schématique de la technologie permettant la relâche directe d'Ang II par une cellule donnée. La protéine de fusion possède un peptide signal (PS) du côté N-terminal qui la dirige dans la voie de sécrétion constitutive. Un fragment d'immunoglobuline (Fc) lui confère de la masse. Le segment pro (PRO) de la prorénine humaine sert d'espaceur moléculaire pour le clivage par la furine. L'octapeptide angiotensine II (Ang II) est apposé en C-terminal; le site furine est clivé dans la voie de sécrétion constitutive et l'Ang II est libéré de la cellule.

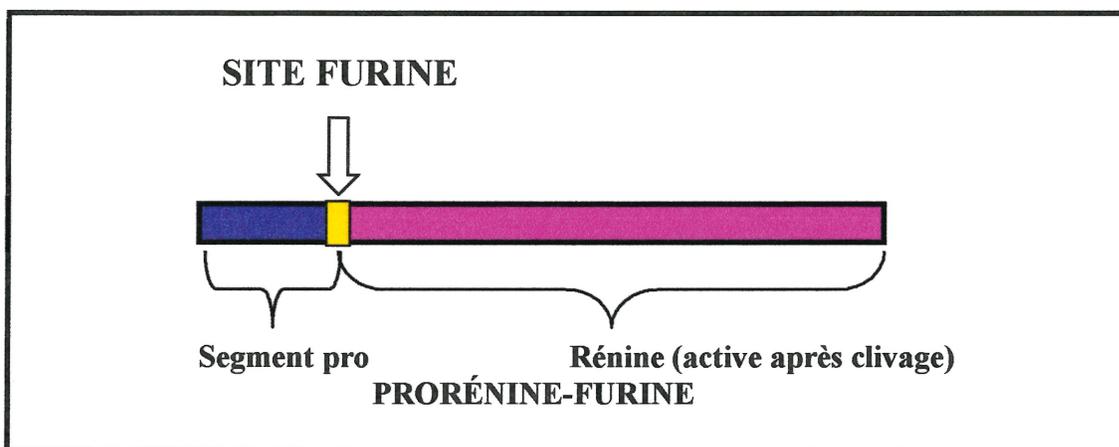


Figure 2.3 : Représentation schématique de la prorénine-furine. Un site furine a été ajouté entre le segment pro et le reste de la prorénine humaine. La protéine entière n'a pas d'activité. Le clivage du site furine libère la rénine active.

ortho-phosphorique (concentration finale 0,5%) froide était ajoutée, puis les tubes demeuraient sur glace pour 15 minutes. Une autre centrifugation suivait (20 000g; 30 minutes; 4°C). Les surnageants étaient appliqués sur des colonnes C18 *Sep-Pak* préalablement équilibrées (4,5 ml de méthanol 90% suivis de 4,5 ml d'H₂O sous 5 kPa). La même pression était conservée pour tout le reste de la préparation des échantillons contenant l'Ang II. Les colonnes étaient lavées deux fois avec de l'eau. L'élution était effectuée avec 2 ml de méthanol 90%. Les échantillons étaient séparés en deux et séchés au *speed-vac*. Ils étaient ensuite utilisés pour le RIA.

2.2.3. Préparation des cellules.

Les cellules étaient centrifugées (200g; 10minutes; 4°C) et lavées avec du PBS 1X pH 7,2. Elles étaient ensuite congelées dans l'azote liquide. Deux ml d'une solution d'EtOH 80%/HCl 1 N froide étaient ajoutés aux culots de cellules congelées. Elles étaient homogénéisées au Polytron, puis centrifugées à 15 000g; 30 minutes; 4°C. Les surnageants étaient transférés évaporés avec un flux d'azote jusqu'à une réduction de 50% par rapport au volume de départ. Une solution d'acide *ortho*-phosphorique (concentration finale 0,5%) froide était ajoutée, puis les tubes demeuraient sur glace pour 15 minutes. Une autre centrifugation suivait (20 000g; 30 minutes; 4°C) Une autre centrifugation suivait (20 000g; 30 minutes; 4°C), après quoi les surnageants étaient appliqués sur des colonnes C18 *Sep-Pak* préalablement équilibrées (voir section précédente).

2.2.4. Détection de l'Ang II par radio-immunoassai (RIA).

Des dilutions d'Ang II étaient préparées dans du tampon Ang I + 8-OH + PMSF 1 mM pour faire une courbe standard: Solution stock d'Ang II 20 ng/ml dilué 1 dans 2 jusqu'à 0,039 ng/ml. De chaque dilution, 50 µl était utilisés, en duplicata, pour la courbe standard.

Les échantillons d'Ang II séchés au *speed vac* ont été resuspendus dans 100 µl de tampon AI+8OH. L'étape 1 du RIA consistait à mettre les échantillons et les standards en présence d'une quantité constante du traceur ¹²⁵I-Ang II dilué dans du tampon Ang I (marqué à l'¹²⁵I; 8000 cpm par tube), et d'une quantité constante du premier anticorps

(polyclonal lapin 1:80 000 tampon Ang I) capable de reconnaître l'Ang II et l'Ang II*. Les mélanges suivants étaient effectués (Tableau III).

Tableau III: Première étape du RIA servant à détecter l'Ang II. N-S :non-spécifique.

	¹²⁵ I-Ang II (μl)	Tampon AI+8OH (μl)	Standards (μl)	Anti-Ang II (μl)
Tubes ¹²⁵ I-Ang II	50	---	---	---
Tubes N-S	50	150	---	---
Tubes Blanc	50	100	---	50
Tubes standards	50	50	50	50
Tubes échantillons	50	100 (resuspension)	---	50

Les différents tubes étaient incubés 48 heures à 4°C.

Par la suite, les complexes anticorps-antigènes étaient précipités par l'ajout de :

100 μl de NRS (1:50 dans tampon Ang I)

100 μl d'anti IgG (2ème anticorps polyclonal lapin 1:25 dans tampon Ang I)

500 μl de PEG 12,5% (concentration finale 7%)

et par une incubation de 30 minutes à température pièce suivie d'une centrifugation de 10 minutes à 2 500g. Les surnageants étaient aspirés et la radioactivité des culots comptée avec un compteur *gamma*.

2.2.5. Essais enzymatiques de la rénine des surnageants.

Pour les essais enzymatiques, 100 μl des surnageants des cellules transfectées avec des constructions permettant l'expression de la prorénine-furine, et 100μl des surnageants des cellules transfectées avec des constructions permettant l'expression la prorénine native, ont été utilisés. Pour chaque construction (prorénine-furine et prorénine native), deux échantillons subissaient une activation à la trypsine, et deux échantillons n'étaient pas activés. L'activation à la trypsine permet de cliver la prorénine-furine et la prorénine

native, ce qui active la quantité totale prorénine présente dans l'échantillon. Sans activation à la trypsine, seulement la prorénine furine peut être clivée par la furine, alors que la prorénine native ne peut pas être clivée (vérifié expérimentalement). Pour l'activation, les 100 µl de surnageant étaient additionnés de 10X TAB pour une concentration finale de 1X et de trypsine de concentration finale 0,3 mg/ml. Ils étaient incubés 1 heure à température pièce. Les échantillons ne devant pas être activés étaient ajustés à 1X de TAB et incubés comme les autres échantillons. Ensuite, tous les échantillons étaient placés 3 heures à 37°C en présence de 10 µl de substrat de mouton (contenant l'angiotensinogène), de 100 µl de tampon acide malique+8OH, et de 1 µl de PMSF 100 Mm.

2.2.6. RIA pour détecter l'Ang I produite lors de la réaction enzymatique de la rénine avec son substrat.

Aux milieux de réaction enzymatique étaient ajoutés directement 50 µl ¹²⁵I-Ang I, et 50 µl d'anti-Ang I (polyclonal lapin 1:6 000 dans tampon Ang I). La courbe standard et les différents contrôles étaient affectés comme à la section 2.2.5 (Tableau III) en substituant l'Ang II, le traceur Ang II* et les anti-Ang II, par l'Ang I, le traceur Ang I*, et les anti-Ang I. La première étape du RIA nécessitait cependant une incubation de seulement 1 heure 30 minutes. Le reste du RIA était effectué exactement comme à la section 2.2.5.

2.3. Génération des souris transgéniques:

Des ovules fécondés 50% C3H et 50% C57BL/6 ont été micro-injectés (Méthot et al., 1995) avec les deux constructions présentées à la figure 3.2 pour avoir l'expression dans les macrophages (promoteur SR-A) ou dans les macrophages et les monocytes (promoteur gp91-PHOX).

2.3.1. Préparation des constructions d'ADN pour la transgénèse.

Pour les souris SR-A, le fragment Fc-pro-Ang II a été sorti de son vecteur d'origine par une digestion HindIII/BamHI. Le vecteur Pal I contenant le promoteur SR-A et la queue de l'hormone de croissance humaine a été ouvert au niveau de son *polylinker* par une digestion HindIII/BamHI et une ligation a été effectuée. Pour les souris PHOX, le

promoteur gp91-PHOXb a été retiré de son vecteur d'origine par une digestion XbaI/BamHI. Un plasmide contenant le transgène Fc-pro-Ang II et la β -globine a été ouvert par une digestion HindIII. Le vecteur et l'insert ont été rempli grâce à la *Klenow* selon les recommandations du fournisseur et une ligation avec la T4 ligase a été effectuée.

Des bactéries XL-1 compétentes ont été transformées et placées sur des milieux de sélection contenant ampicilline 0,1 mg/ml pour une incubation o/n à 37°C et 5% de CO₂. Les colonies ont été repiquées dans du milieu LB avec ampicilline 0,1 mg/ml. 2,5 ml ont été utilisés pour préparer de l'ADN; le reste était conservé à -80°C avec 15% de glycérol pour servir d'inocula. L'ADN obtenu a été digéré afin de vérifier la présence et l'orientation de l'insert. L'ADN digéré était placé sur gel d'agarose 0,8% + EtBr (10 μ l d'EtBr 10 mg/ml pour 100 ml de solution d'agarose) pour une migration de 30 minutes à 100 mV. Les inocula correspondant aux ADN montrant les bons patrons de migration sur gel d'agarose + EtBr 10 mg/ml ont été utilisés pour la préparation de plus grandes quantités d'ADN afin d'en obtenir suffisamment pour les expériences subséquentes. La concentration des solutions d'ADN obtenues était mesurée grâce à la D.O. à 260 nm (D.O._{260 nm} d'une dilution 1/100 X 5 = concentration en μ g/ μ l). Leur pureté était évaluée par le ratio D.O.₂₆₀/D.O.₂₈₀ (ratio de 1,8 à 2 = pureté adéquate). Les ADN ont également subi les digestions nécessaires à la vérification de leur identité, et ont été séquencés avant d'être utilisés pour la transgénèse.

2.3.2. Séquençage des constructions.

Les constructions d'ADN ont toutes été séquencées par Ceq 2000 XL (Becman Coulter Inc., Mississauga, Ontario) avec la méthode des didéoxyribonucléotides (Kukanskis, 2000).

2.3.3. Préparation de l'ADN pour l'envoyer à la micro-injection.

La construction destinée à produire les souris SR-A a été digérée NotI/XhoI. Le fragment à injecter avait 6,9 kb. La construction destinée à produire les souris PHOX a été digérée XbaI/NdeI relâchant le fragment à injecter de 3,4 kb. Une migration sur gel d'agarose

0,8% avec EtBr a été effectuée afin de vérifier la qualité de la digestion et la présence des fragments destinés à servir pour la micro-injection d'ovules fécondés 50% C3H et 50% C57BL/6. Les échantillons digérés ont été expédiés au service de micro-injection de l'IRCM.

2.4. Identification les souris positives pour le transgène parmi les fondateurs potentiels.

2.4.1. Préparation de l'ADN.

Les souris fondatrices reçues du service de micro-injection ont été testées par PCR. L'ADN de bouts de queues a été isolé par la méthode au phénol-chloroforme (Sambrooke, 1988): les queues ont été digérées toute la nuit dans du Tampon de Digestion + 1 mg/ml de protéase. Une extraction au chloroforme était effectuée, et l'ADN était précipité avec de l'éthanol 95%. Il était ensuite lavé avec de l'éthanol 70%, lyophilisé, puis resuspendu dans 100 µl de T₁₀E₁.

2.4.2. Conditions de PCR pour les souris SR-A et PHOX.

Un µl de l'ADN obtenu était utilisé pour le PCR. L'ADN était chauffé à 55°C avant le PCR. Les oligonucléotides utilisés sont présentés à la figure 3.2.

	Mélange pour souris R-A	Mélange pour souris PHOX
ADN :	1 µl	1 µl
Oligos 100 ng/µl :	1 µl de 210 1 µl de 547	1 µl de 621 1 µl de 624
Tampon Taq:	2 µl	2 µl
Taq polymérase :	0,5 µl	0,5 µl
H ₂ O :	15,5 µl	15,5 µl

Le PCR comportait les cycles suivants : 1 : 1X (3 min à 94° C). 2 : 35X (1 min à 94° C, 1 min à 50° C, 1 min à 72° C). 3 : 1X (10 min à 72° C). Les souris identifiées comme transgéniques ont été croisées avec des souris C57BL/6.

VOIR FIGURE 3.2 POUR LA SÉQUENCE DES OLIGOS.

2.5. RNase protection sur l'ARN de macrophages.

Une RNase protection a été effectuée afin de vérifier l'expression du transgène par les macrophages des souris de la F1. Il était nécessaire de stimuler les macrophages de la cavité péritonéale, d'en isoler l'ARN, d'en vérifier la qualité et de tester la présence de l'ARN produit à partir du transgène.

2.5.1. Stimulation des macrophages de la cavité péritonéale des souris transgéniques.

Une stimulation au thioglycollate a été effectuée, avec une solution contenant 38,5 g de thioglycollate par litre d'H₂O. Trois millilitres de cette solution ont été injectés intrapéritonéalement à des souris de deux mois ou plus, avec des aiguilles de 26g 1/2". Quatre jours post-stimulation, les souris étaient sacrifiées par dislocation cervicale. Immédiatement après le sacrifice, 8 ml de PBS 1X étaient injectés dans la cavité péritonéale (aiguilles de 26 g 1/2"), la peau était retirée et les cellules de la cavité intrapéritonéale étaient récoltées avec une aiguille de 18 g. Les cellules étaient immédiatement centrifugées (200 g; 10 min). Le surnageant était retiré et conservé et traité pour le dosage de l'Ang II, et les cellules étaient congelées en plongeant le tube dans l'azote liquide et conservées à -80°C jusqu'à l'isolation de leur ARN ou de l'Ang II. Aussi, les tissus qui étaient prélevés étaient immédiatement plongés dans l'azote liquide et conservés à -80°C jusqu'à l'isolation de leur ARN.

2.5.2. Isolation de l'ARN des macrophages.

Aux culots de macrophages congelés étaient ajouté 3 ml de solution dénaturante avec β -mercapto-éthanol. Ils étaient passés au Polytron, puis ils subissaient une extraction au phénol-chloroforme (+ 0,3 ml 2 M NaOAc pH 4,0 + 3,0 ml de phénol saturé en tampon + 0,6 ml de chloroforme). Les tubes étaient incubés sur glace 15 minutes à 0°C. Après centrifugation à 10 000 g à 4°C, la phase supérieure était transférée et précipitée en ajoutant isovolume d'isopropanol 100%. Le culot recueilli grâce à une centrifugation de 10 minutes à 4°C à 10 000g subissait un traitement au LiCl 4 M (800 μ l) afin d'éliminer le glycogène qu'il contenait. Suivait une centrifugation de 10 minutes à 4°C à 10 000 g, suite à laquelle le culot était resuspendu dans 400 μ l de T₁₀E₁S_{0,1%}. L'ARN était précipité

jusqu'au lendemain à -80°C (+ 40 μl NaOAc 3 M pH 5,2 + 900 μl éthanol 95%). Il était ensuite lavé avec de l'éthanol 70%, lyophilisé, puis resuspendu dans 50 μl de $\text{T}_{10}\text{E}_1\text{S}_{0,1\%}$. La concentration des solutions d'ARN obtenues était mesurée grâce à la D.O. à 260 nm ($\text{D.O.}_{260\text{nm}}$ d'une dilution 1/100 X 4 = concentration en $\mu\text{g}/\mu\text{l}$). La qualité des ARNs obtenus était vérifiée. Les échantillons étaient chauffés à 70°C pendant 15 minutes, 15 μl de tampon d'échantillon leur était ajouté, puis ils étaient placés sur un gel 1% d'agarose contenant MOPS pour une migration d'une heure à 60 V.

2.5.3. RNase protection pour vérifier l'expression du transgène : méthode détaillée.

2.5.3.1. Synthèse d'une échelle de poids moléculaire radioactive.

Cinq μg d'une échelle de poids moléculaires ont été utilisés pour la préparation. L'ADN a été phosphatasé (2 μl de CIAP + 5 μg d'ADN + H_2O jusqu'à 50 μl) pour 1 heure à 37°C . Du SDS était ajouté (concentration finale 1%), suite à quoi une extraction était effectuée avec un volume de phénol-chloroforme. Une précipitation suivait : 2 volumes d'éthanol 100% + 10% de volume de NaOAc 3 M pH 5,2). Le culot était resuspendu dans du T_{10}E_1 .

Un μg de l'échelle phosphatasée était utilisé pour le marquage radioactif. La réaction suivante était effectuée : 1 μg d'échelle phosphatasée; 2,5 μl de 10X MSB; 50 μCi [γ - ^{32}P]-ATP; 1 μl de PNK; H_2O jusqu'à 25 μl . La réaction durait 30 minutes à 37°C . Du SDS était ajouté (concentration finale 1%), suite à quoi une extraction était effectuée avec un volume de phénol-chloroforme. Une précipitation suivait : 2 volumes d'éthanol 100%; 10% de volume de NaOAc 3 M pH 5,2; 2 μg d'ARNt; H_2O jusqu'à 50 μl ; 2 volumes d'ÉtOh 95%. L'échantillon était incubé 5 minutes à -80°C . Il était ensuite centrifugé 2 minutes à 4°C , puis resuspendu dans 45 μl d' H_2O . Il était reprécipité : 10% de volume de NaOAc 3 M pH 5,2; 2 volumes d'ÉtOh 95%. L'échelle de 100pb radioactive était resuspendue dans 50 μl de T_{10}E_1 et conservée à -80°C .

2.5.3.2. Digestion des matrices d'ADN.

Les matrices d'ADN présentées à la figure 2.4 étaient digérées (20 µg de chacune) avec environ 40 U enzymatiques, dans un volume final de 100 µl pour 3 heures à 37°C, et avec la concentration appropriée de *Onephorall buffer* (OPA). Matrice histone : BamHI 2XOPA; Fc-pro-AII : PvuII 1XOPA; F4/80 : KpnI 2XOPA. La digestion était vérifiée en faisant migrer un échantillon de 2 µg à 100mV pour 30 minutes sur gel d'agarose 0,8% avec EtBr. Une extraction au phénol-chloroforme était effectuée et les matrices étaient resuspendues dans l'eau pour une concentration finale de 2 µg/µl.

2.5.3.3. Synthèse des sondes.

La réaction de synthèse des sondes a été effectuée 1h à 37° C dans la solution suivante : *transcription optimized 1X buffer*; DTT 10 mM; 0,850U/ul de *RNA guard*; 0,5 mM rATP; 0,5 mM rUTP; 0,5 mM rGTP; rCTP 36 uM; matrice d'ADN 0,1 ug/ul; 2,5 uCi d' [α -³²P]-CTP; T3 ou T7 RNA pol 1 U/ul. Les sondes produites ont été purifiées par l'ajout de 0,1 U/ul de RQ1 DNase sans RNase pour 15 min à 37°C. Elles ont été extraites au phénol-chloroforme avec 0,2 mg/ml d'ARNt de levure et précipitées dans 3,75 M de NH₄OAc avec 3 volumes d'éthanol 100%. Elles ont été resuspendues dans du tampon d'hybridation 80% formamide (80% formamide désionisée; PIPES 40mM; NaCl 0,4M; EDTA 1mM). Des solutions contenant 1600cpm/ul de chaque sonde ont été préparées dans du tampon d'hybridation 80% formamide. Cinq ul du mélange de sonde a été mélangé à 10 ug d'ARN de macrophages ou de tissus dans du tampon d'hybridation 80% formamide pour un volume final de 30 ul. Les mélanges ont été chauffés 3 min à 90°C puis incubés toute la nuit à 45°C.

2.5.3.4. Digestion aux RNAses.

Les échantillons ont été digérés à 25°C pour 30 min dans la solution de RNAses. Du SDS était ajouté pour une concentration de 0,66% avec 0,33mg/ml de protéinase K pour 30 min à 37°C. Tous les échantillons étaient ensuite extraits au phénol-chloroforme et précipités à l'éthanol de la même façon que les sondes. Ils étaient resuspendus dans du *loading buffer*, bouillis 5 min et migraient sur gel d'acrylamide 6% à 45V. Le gel était

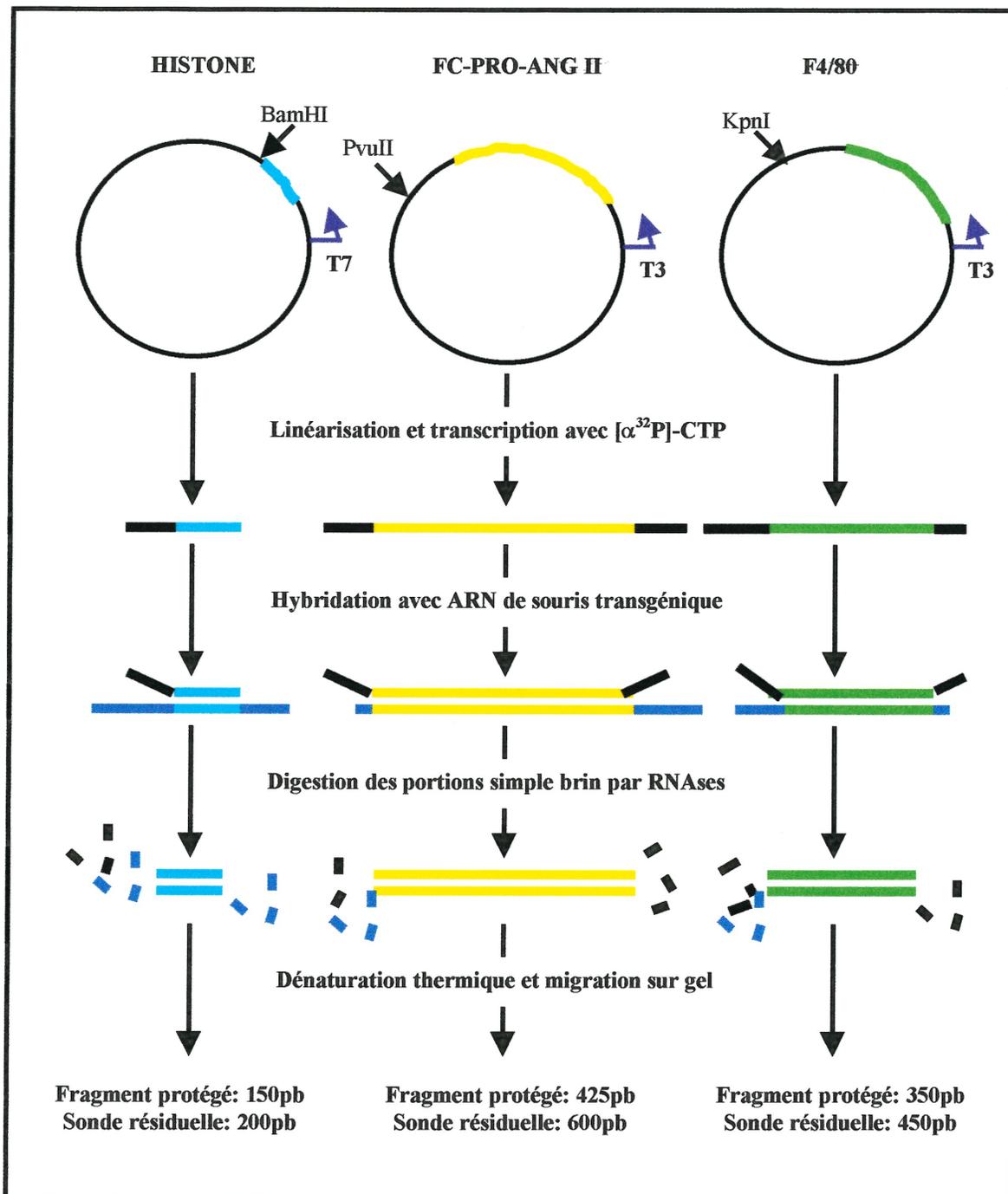


Figure 2.4 : Représentation schématique des matrices d'ADN utilisées pour la synthèse de sondes d'ARN. A : Plasmide permettant la synthèse de la sonde histone par l'ARN polymérase T7. La longueur totale de la sonde est de 200pb alors que le fragment protégé a 150pb ; B : Plasmide permettant la synthèse de la sonde Fc-pro-Ang II par l'ARN polymérase T3. La longueur totale de la sonde est de 625pb alors que le fragment protégé a 425pb ; C : Plasmide permettant la synthèse de la sonde F4/80 par l'ARN polymérase T3. La longueur totale de la sonde est de 450pb alors que le fragment protégé a 350pb. Après leur synthèse, les sondes antisens radioactives sont hybridées à l'ARN.

Elles sont digérées par des RNAses spécifiques pour l'ARN simple brin. Si l'ARN messager auxquelles elles correspondent est présent dans le mélange d'hybridation, un fragment apparaît sur le gel d'acrylamide pour les longueurs totales et les longueurs protégées. Si l'ARN est absent, on ne voit sur l'autoradiogramme que les longueurs totales qui correspondent à la sonde résiduelle non-digérée.

transféré sur papier Whattman et séché. Le papier était exposé dans une cassette avec un écran intensificateur et un film Kodak.

2.6. Southern blot pour identifier les lignées

2.6.1. Préparation de l'ADN génomique.

Vingt microgrammes d'ADN génomique (préparé par méthode au phénol-chloroforme) ont été digérés toute la nuit à 37°C) avec 40 unités de BamHI (SRA A, PHOX A et PHOX B) ou HindIII (SRA B). Ils migraient sur un gel de 18 cm à 0,8% d'agarose + EtBr dans du TAE 0,5X à 30 V pour toute la nuit. avec une échelle de 1 kb. Le gel était placé dans la solution de dénaturation (0,4M NaOH) avec agitation pour 30 min. Un transfert par gravité sur membrane genescreen plus pendant 3 heures était effectué.

2.6.2. Synthèse de la sonde.

Cent nanogrammes de matrice d'ADN (Fc-proAng II : 1 kb) étaient chauffés à 100°C et utilisés pour la synthèse d'une sonde d'ADN radioactive avec le *random primer DNA labelling system* de Gibco BRL selon leur protocole. La sonde produite était resuspendue dans du TE et utilisée pour l'hybridation avec l'ADN fixé à la membrane à 1 million cpm/ml

2.6.3. Préhybridation et hybridation.

Après le transfert, la membrane était lavée avec du 2X SSC et placée dans un incubateur rotatif dans la solution de préhybridation pour une nuit à 42°C. Le lendemain, la sonde était synthétisée et ajoutée à la solution d'hybridation (1 million cpm/ml), puis la membrane était transférée dans la solution d'hybridation pour 48 heures à 42°C à l'incubateur rotatif. La membrane était ensuite lavée : 5 min à température pièce (2X SSC; 0,5% SDS); 1 heure à température pièce (2X SSC; 0,1% SDS); 1 heure à 37°C (0,1X SSC; 0,5% SDS). Elle était ensuite lavée avec du 1X SSC et exposée au *Phosphorimager* pour trois jours.

2.7. RIA pour doser l'Ang II des macrophages de souris transgéniques.

2.7.1. Traitement des surnageants des cellules intrapéritonéales.

Les surnageants (de l'étape 2.5.1) étaient bouillis 5 minutes pour dénaturer les protéines. Ils étaient ensuite centrifugés 10 minutes à 4°C à 10 000 rpm dans le rotor SM-24. Les surnageants étaient appliqués sur de colonnes C18 préalablement équilibrées (4,5 ml de méthanol 90% suivis de 4,5ml d'H₂O sous 5 kPa). La même pression était conservée pour tout le reste de la préparation des échantillons contenant l'Ang II. Les colonnes étaient lavées deux fois avec de l'eau. L'élution était effectuée avec 2ml de méthanol 90%. Les échantillons étaient séparés en deux et séchés au *Speed-Vac* (≈2 heures). Ils étaient ensuite utilisés pour le RIA décrit à la section 2.2.5.

2.8. RNase protection sur ARN de tissus.

Immédiatement après le sacrifice par dislocation cervicale, les organes étaient prélevés et plongés dans l'azote liquide. Leur ARN était ensuite isolé avec la méthode décrite à la section 2.5.2 pour les macrophages congelés. Leur qualité était évaluée de la même manière que pour les macrophages également (section 2.5.2). Pour la RNase protection, voir la section 2.5.3.

2.9. Développement d'un essai pour quantifier les macrophages présents dans les tissus.

2.9.1. Clonage d'une portion du gène f4/80 (expression spécifique aux macrophages) par PCR.

Une revue de la littérature a permis de sélectionner le gène F4/80 pour son expression spécifique aux macrophages. Le clonage de ce gène est présenté à la figure 3.10. De l'ADN de queue de souris C57BL/6 a été préparé selon la méthode décrite à la section 2.4.1. La séquence obtenue sur *NCBI (National Center for Biotechnology Information)* étant celle de l'ARNm, un alignement de séquences par *BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)* a permis de positionner les différents exons et de choisir des oligonucléotides situés dans un seul exon. Trois cent quarante-huit pb du dernier exon ont

été clonés par PCR, une digestion EcoRI/BamHI a été effectuée et le fragment obtenu a été inséré par ligation dans un vecteur ouvert avec les mêmes enzymes.

2.9.2. Synthèse d'une sonde radioactive.

Une sonde radioactive a été produite à partir de la construction effectuée et de la polymérase T3 (Figure 2.4). Une RNase protection a été effectuée suivant la méthode décrite aux sections 2.5.3.2-2.5.3.6.

3. CHAPITRE III: RÉSULTATS

3.1. Vérification de la présence de la furine dans les macrophages.

La biosynthèse de l'Ang II est présentée à la figure 1.2. Le ciblage de l'expression de l'Ang II à un type particulier de cellules requiert l'utilisation d'une protéine de fusion développée dans le laboratoire (Figure 2.2).

Afin de s'assurer qu'il était possible de développer un modèle de souris transgéniques dont les macrophages qui expriment cette protéine de fusion libéreraient l'Ang II, il fallait évidemment vérifier la présence de cette enzyme dans les macrophages. Les macrophages de culture primaire étant difficiles à transfecter avec succès, une lignée de cellules immortalisée a été choisie pour les transfections. Les cellules j774, macrophages immortalisés issus de souris femelles BALB/c, sont souvent utilisées dans les expériences qui étudient le comportement des macrophages dans des modèles d'athérosclérose, et ils présentent les caractéristiques des macrophages activés (Kruth, 2001). Ainsi, des cellules j774 ont été transfectées avec deux constructions. La première permettait l'expression de la protéine de fusion qui, clivée par la furine, génère l'Ang II (Figure 2.2). L'autre construction permettait l'expression d'une pro-rénine humaine modifiée, dont un site furine, placé entre le segment pro et le reste de la protéine, doit être clivé pour que la cellule libère la rénine active dans le surnageant (Figure 2.3) (Methot et al., 1997).

D'abord, parmi les produits de transfection testés avec les cellules j774 (lipofectamine 2000 et DEAE-Dextran), le DEAE-Dextran à 40 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ s'est avéré le plus efficace (Mack et al., 1998). En effet, la lipofectamine 2000 et les autres concentrations de DEAE-Dextran utilisées (10, 20 et 80 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) n'ont pas permis une efficacité de transfection suffisante pour que la présence de la furine soit détectée.

En ce qui concerne les deux stratégies employées pour détecter l'activité de la furine, les constructions d'ADN ayant servi aux différentes transfections sont présentées aux figures 2.2 et 2.3. La première protéine de fusion, Fc-pro-Ang II, est envoyée dans la voie de sécrétion constitutive grâce à un peptide signal en N-terminal. Un fragment

d'immunoglobuline lui a été ajouté pour lui conférer une plus grande masse et une stabilité accrue. Un segment pro de la prorénine humaine lui a été ajouté et sert d'espaceur moléculaire nécessaire au clivage par la furine, au site furine qui précède l'Ang II, peptide situé en C-terminal de la protéine. Lorsqu'il y a clivage dans la voie de sécrétion constitutive, l'Ang II est libérée hors de la cellule qui exprime la protéine de fusion (van Kats et al., 2001) (Figure 2.2). Or, les RIAs effectués sur les surnageants des cellules j774 transfectées exprimant cette protéine n'ont pas permis de détecter l'Ang II, pas plus que les RIA effectués sur le contenu intracellulaire des cellules transfectées.

En ce qui concerne la seconde méthode utilisée pour démontrer la présence de furine dans les macrophages, les cellules j774 ont été transfectées avec les constructions présentées à la figure 2.3, et la figure 3.1 illustre la stratégie employée.

Brièvement, des cellules j774 sont transfectées avec une construction permettant l'expression et la relâche dans le surnageant d'une prorénine modifiée, dont un site furine ajouté en C-terminal du segment pro permet l'activation par la furine (Figure 3.1A). Vingt-huit heures post-transfection, le surnageant est récolté. À ce point, l'expérience se sépare en deux. Certains surnageants sont utilisés directement dans un essai enzymatique avec l'angiotensinogène. La génération d'Ang I mesurée par RIA témoigne de l'activité de la rénine activée par la furine dans la voie de sécrétion constitutive des cellules transfectées. Les autres surnageants de cellules transfectées avec prorénine-furine sont activés par la trypsine, qui clive toutes les prorénines-furine et qui permet de connaître l'activité totale des surnageants. En soustrayant l'activité rénine activée à l'activité totale, on obtient l'activité prorénine. Ainsi il est possible de savoir qu'elle proportion de la protéine de fusion exprimée est clivée par la furine. Dans ce cas-ci, la totalité de la protéine exprimée est clivée (Figure 3.1C).

La Figure 3.1B illustre le contrôle effectué. Des cellules j774 sont transfectées avec la prorénine native, qui ne peut pas être activée par la furine puisqu'elle n'en possède pas le site. Sans activation à la trypsine, aucune activité rénine ne devrait être détectée, alors

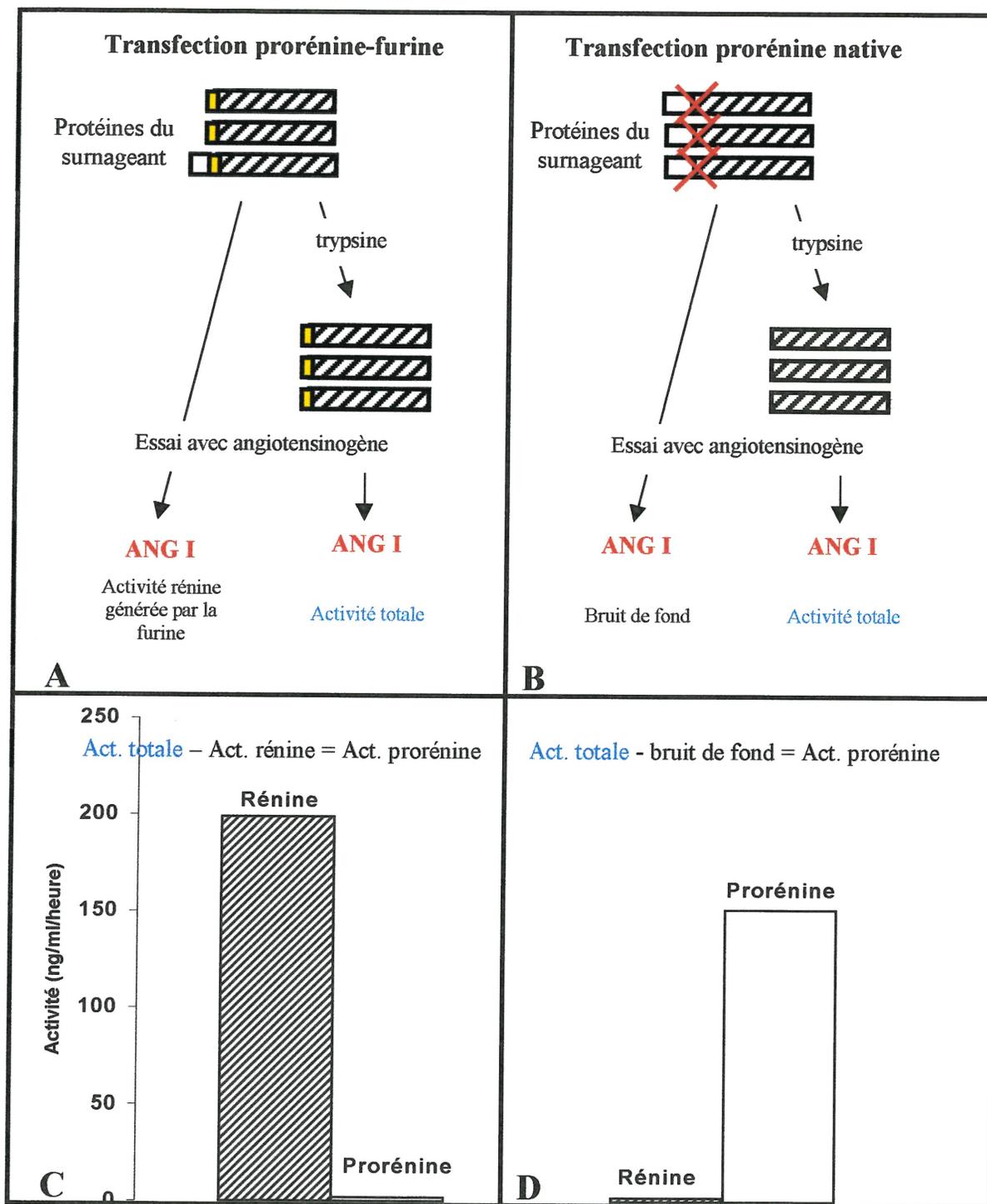


Figure 3.1 : Représentation schématique de la stratégie permettant la vérification de la présence de la furine dans une cellule donnée. A : La protéine dans les surnageants correspond à celle illustrée en détail à la figure 2.2. La furine des vésicules de sécrétion des cellules transfectées clive la protéine, et la rénine active se retrouve dans le surnageant. En activant le surnageant à la trypsine, on obtient l'activité totale. B : La

protéine exprimée est la prorénine native qui ne peut pas être activée par la furine. Une activation à la trypsine donne l'activité totale. C : L'activité prorénine est obtenue en soustrayant l'activité rénine à l'activité totale. Dans ce cas l'activité du surnageant est uniquement l'activité de la rénine activée par le clivage par la furine. D : Le surnageant des cellules transfectées avec la prorénine native ne possède que l'activité prorénine.

qu'avec l'activation, l'activité totale de la prorénine est détectée. Ceci est démontré à la figure 3.1D.

En conclusion à cette section, la figure 3.1C et D démontre que dans les cellules transfectées avec prorénine-furine, la majeure partie de l'activité des surnageant est celle de la rénine activée par la furine, alors que les surnageant des cellules transfectées avec la prorénine native ont seulement une activité reliée à la présence de prorénine. Ceci confirme la présence de la furine dans les macrophages et sa capacité à cliver une protéine de fusion dotée d'un site furine.

3.2. Transgénèse et identification des souris transgéniques.

Les promoteurs choisis pour cibler l'expression chez les souris transgéniques sont le SR-A pour l'expression restreinte aux macrophages (Horvai et al., 1995) et le gp91-PHOX pour une expression chez les macrophages et les monocytes (Skalnik et al., 1991). Ils ont tous deux été clonés en amont de la séquence permettant l'expression de Fc-pro-Ang II (Figure 3.2). Ils ont par la suite été séquencés. Le clonage s'est avéré efficace et des échantillons d'ADN ont été préparés pour la micro-injection d'ovules fécondés 50% C3H 50% C57BL/6. Les souris fondatrices ont été testées par PCR. Le taux de succès de la transgénèse a dépassé 60% pour les souris SR-A et 30% pour les souris PHOX.

Les fondatrices positives ont été croisées avec des souris C57BL/6. Par PCR, la progéniture a été testée (3.2). Des souris positives de chaque lignée ont été obtenues. Certaines ont été sélectionnées pour la vérification de l'expression du transgène au niveau de l'ARN messager des cellules recrutées dans la cavité péritonéale après stimulation au thioglycollate.

3.3. Expression du transgène par les macrophages.

Afin de réunir un nombre de macrophages suffisant pour procéder à une extraction d'ARN et à une RNase protection, les macrophages ont été recrutés dans la cavité péritonéale grâce à une stimulation au thioglycollate. Quatre jours post-stimulation, les cellules pouvaient être récoltées. Elles étaient enrichies à 90% en macrophages vu le

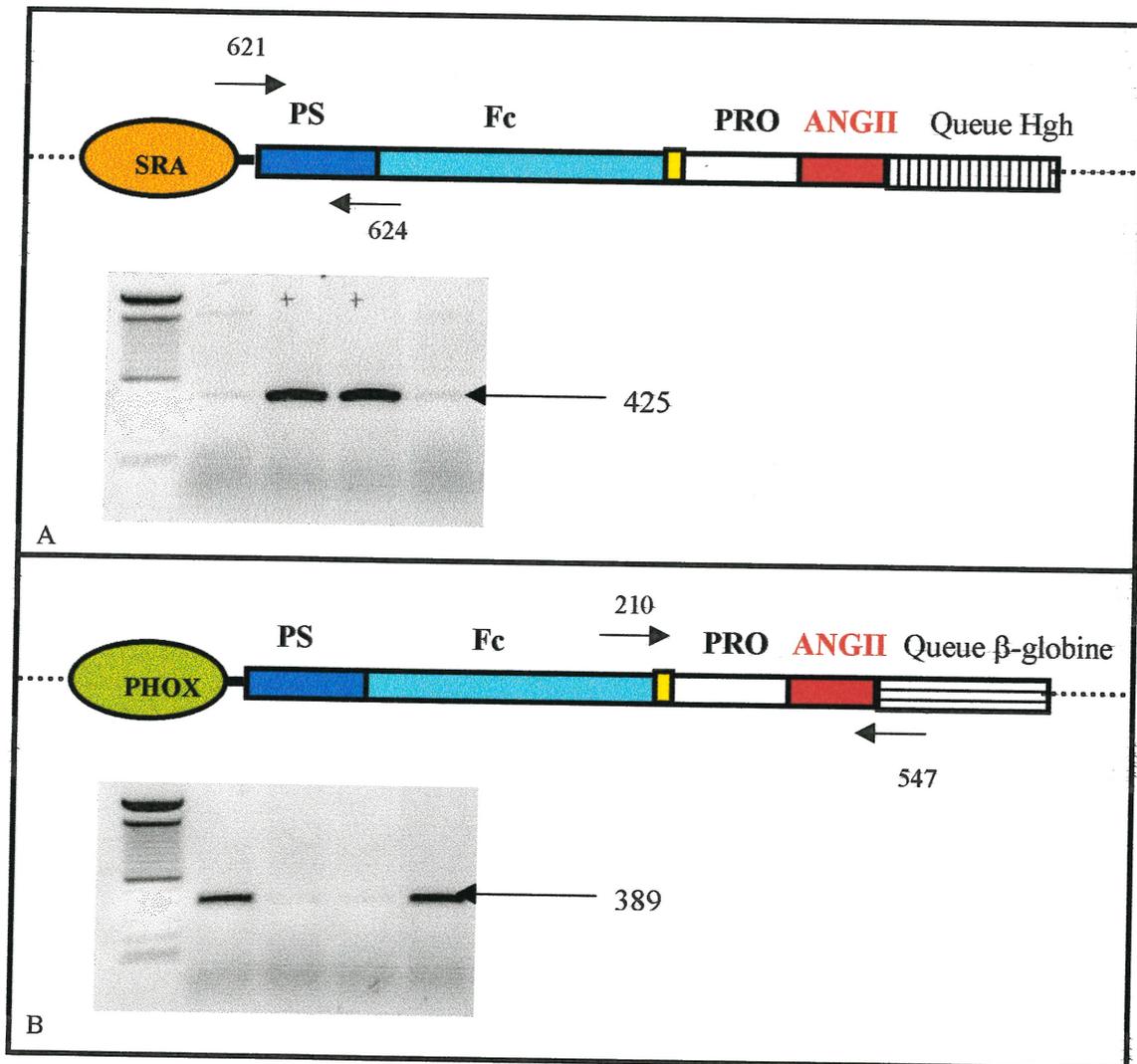


Figure 3.2 : Constructions d'ADN réalisées pour la transgénèse et réaction de polymérisation en chaîne (PCR) pour la détection des transgéniques. A : SRA : 291pb du promoteur proximal du récepteur *scavenger A*, et 400pb de l'élément enhancer en amont de ce promoteur, fourni par Dr Christopher K. Glass (Horvai et al. 1995) ont été placées en amont de la séquence codant pour la protéine Fc-pro-Ang II. La queue de l'hormone de croissance humaine (Hgh) assure la stabilité à l'ARNm. Par PCR avec les oligos 621 (aaacctgtgcattgatga) et 624 (aaaccagctgatctggac) sur de l'ADN de queue de souris, un fragment de 425pb est obtenu. B: PHOX : Les pb -1541 pb à +1 du promoteur de la glycoprotéine gp91-PHOX fourni par Dr Stuart H. Orkin (Skalnik et al. 1991) ont été clonées en amont de la séquence Fc-pro-Ang II. La queue de la bêta-globine fournit la stabilité à l'ARNm. Par PCR avec les oligos 210 (ttctcatgcaacgtgagac) et 547 (tggtgatacaaggacatc) sur de l'ADN de queue de souris, un fragment de 389pb est obtenu.

nombre de jours d'incubation (Skalnik et al., 1991). Leurs ARNs étaient isolés et la qualité en était évaluée avant de procéder à la RNase protection. La méthode utilisée pour l'isolation a donné des rendements suffisant en quantité et en qualité pour permettre l'utilisation de ces ARNs pour une RNase protection (Figure 3.3). Les bandes apparaissant sur gel d'acrylamide visualisée aux UVs grâce au bromure d'éthyldium correspondent aux ARNs ribosomiaux qui sont présent en grande quantité dans la cellule. Pour que des ARNs soient considérés d'une qualité suffisante, l'ARNr 28S doit donner une bande 1,5 fois plus intense que l'ARNr 18S. La quantité d'ARN obtenue, 50 µg, suffisait à réaliser 5 RNase protections. La RNase protection effectuée utilise des sondes radioactives d'ARN antisens à l'ARN messenger transcrit à partir du transgène. Cette sonde, utilisée en excès, permet que le test soit quantitatif. Une sonde est également produite pour mesurer les ARNs messagers d'histone, dont les niveaux d'expression servent de contrôles auxquels sont comparés les niveaux obtenus pour le transgène. La figure 2.4 illustre les matrices d'ADN utilisées pour la production des sondes radioactives.

Parmi toutes les lignées testées à la F1, deux lignées SR-A (A et B) et deux lignées PHOX (A et B) ont été sélectionnées pour les expériences subséquentes. Il est possible de remarquer que les niveaux d'expression obtenus sont variables d'une lignée à une autre. Les niveaux d'expression sont comparés à la figure 3.4B.

Les résultats présentés dans cette section démontrent que les macrophages des souris transgéniques SR-A et PHOX expriment le transgène au niveau de l'ARN messenger, autant lorsque ce transgène est sous le contrôle du promoteur SR-A que sous le contrôle du promoteur gp91-PHOX.

3.4. Suivi des lignées par *Southern Blot*.

Un *Southern Blot* a été développé afin de suivre les lignées. Une sonde a été produite à partir d'un fragment d'ADN d'environ 1 kB correspondant à la séquence de Fc-pro-Ang II. Il a été utilisé pour produire une sonde d'ADN radioactive à l'aide d'une trousse *de random primer DNA probe labeling*. La méthode utilisée permettait de produire un

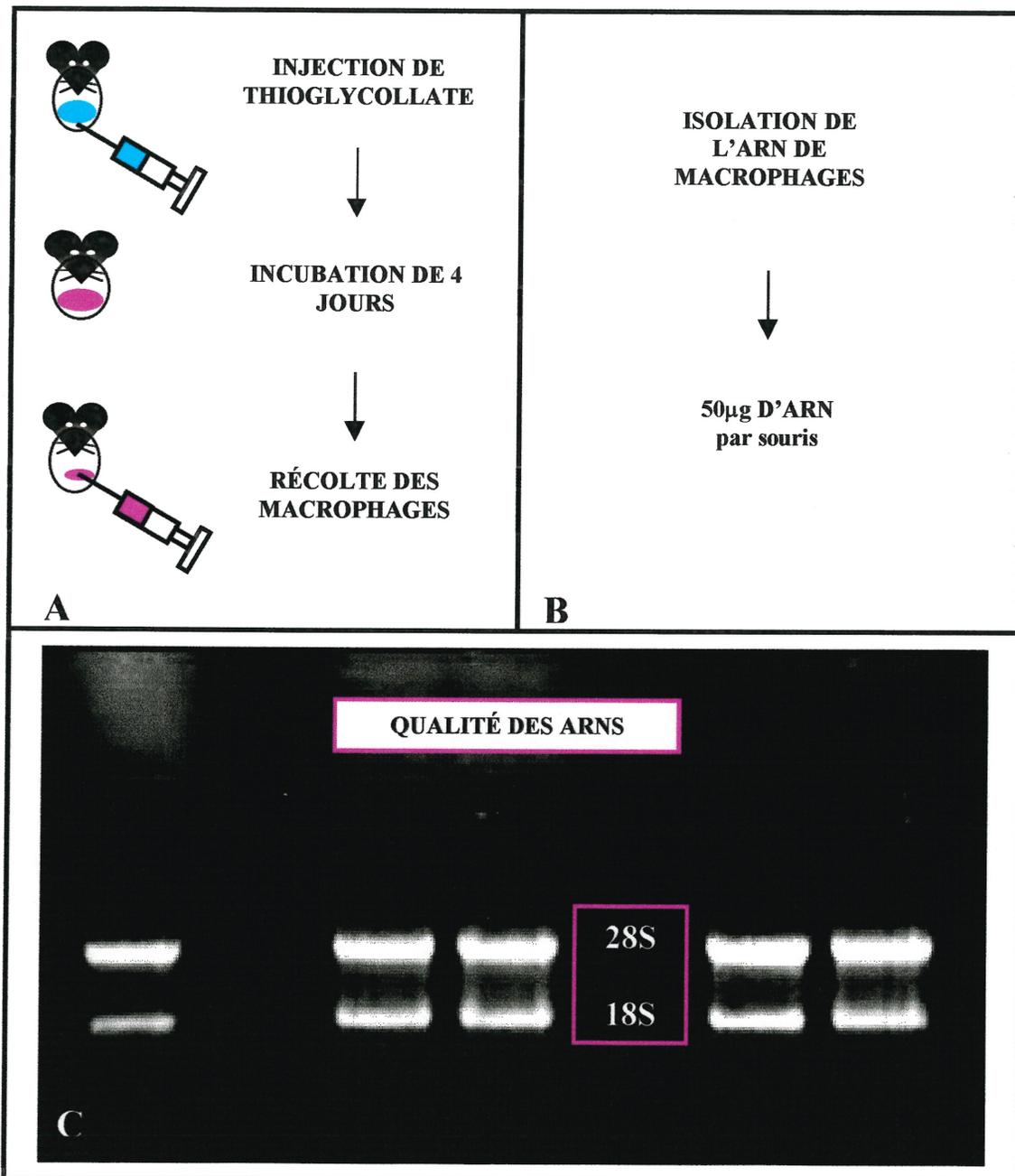


Figure 3.3 : Visualisation de l'ARN isolé des macrophages transgéniques. A : Représentation schématique de la méthode utilisée pour récolter l'ARN des macrophages; B : Rendement quantitatif, C : Rendement qualitatif. La qualité de l'ARN est bonne quand la bande correspondant à l'ARN ribosomal 28S a 1,5 fois l'intensité de celle obtenue pour l'ARN ribosomal 18S.

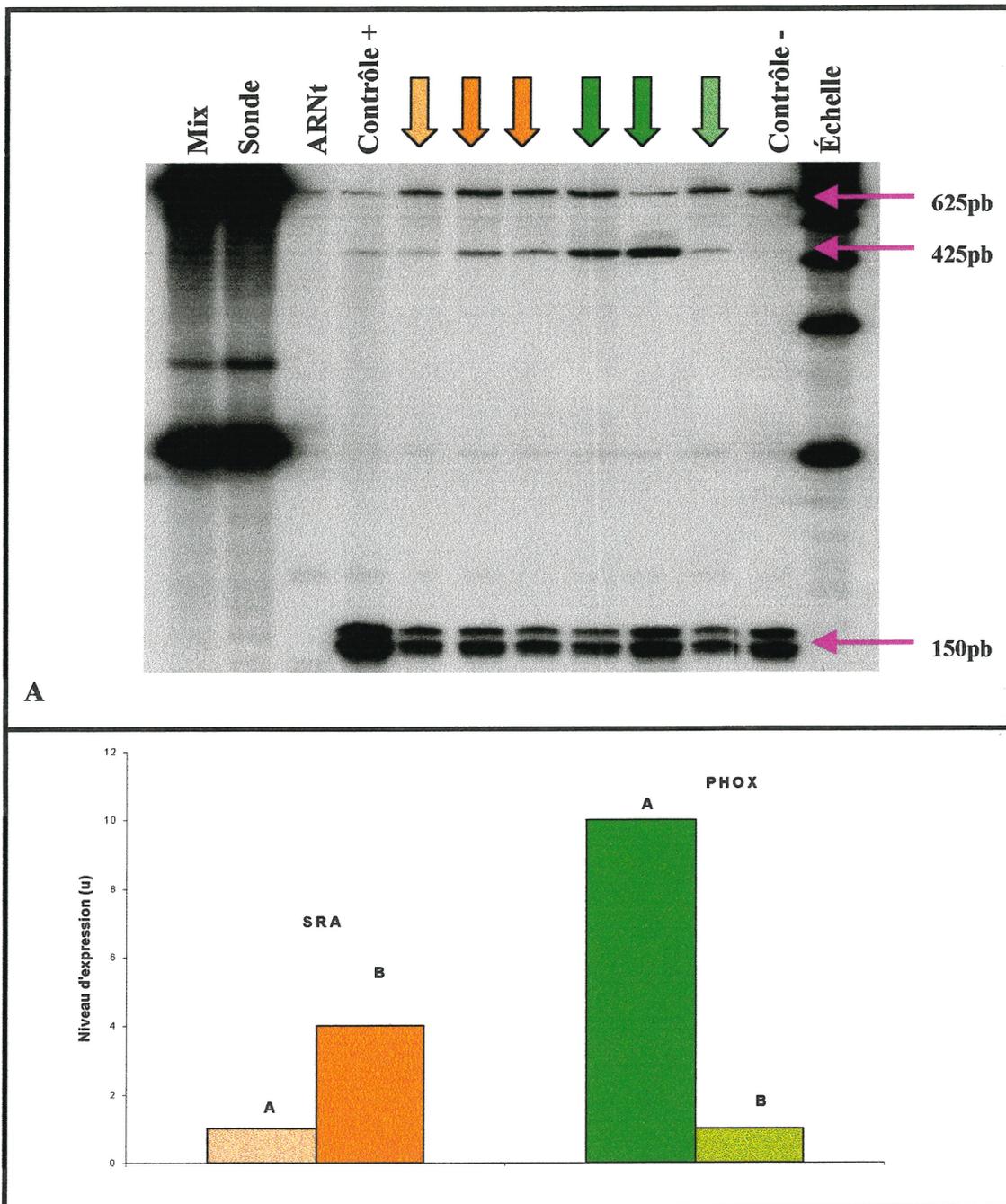


Figure 3.4 : Expression du transgène chez les souris SR-A et PHOX. A : Il est possible d'observer dans le puits sonde une bande à 200pb qui correspond à la sonde histone et une bande à 625 pb qui correspond à la sonde Fc-pro-AngII (voir figure 3.5). Les fragments protégés sont attendus à 150 et à 425 pb pour histone et Fc-pro-AngII respectivement (Figure 3.5). Ceci correspond au nombre de paires de bases complémentaires entre les ARNm et les sondes, qui sont protégés de la digestion par les RNAses dont la spécificité est l'ARN simple brin. Ces sondes sont en excès par rapport aux quantités d'ARNm utilisées, ce qui rend l'essai quantitatif. La bande à 625 apparaît à tous les puits car une quantité résiduelle n'a pas été digérée par les RNAses. Les puits ARNt et Contrôle négatif servent de contrôles négatifs qui montrent les bandes qui ne

sont pas dues à la présence des ARNm spécifiques au transgène. Pour le puit ARNt apparaissent seulement des bandes dues à de l'hybridation non-spécifique ou à une quantité de sonde résiduelle. Pour le puit N-T, qui contient de l'ARN de souris non-transgénique, un fragment protégé apparaît pour l'ARNm endogène histone, mais pas pour le transgène. Le contrôle positif pour le transgène montre le fragment protégé à 425 pb et à 150. Ce contrôle vient de l'ARN de cellules GH4 transfectées avec une construction permettant l'expression de Fc-pro-AngII sous le contrôle du promoteur RSV. Les puits SR-A A, SR-A B, PHOX A et PHOX B montrent les fragments protégés pour histone et pour le transgène. B : Niveaux relatifs d'expression du transgène Fc-pro Ang II par les lignées SR-A A, SR-A B, PHOX A et PHOX B.

mélange de sondes complémentaires à une séquence de 1 kB du transgène. Les résultats attendus dans le cas d'un seul site ou de deux sites d'intégration pour les deux transgènes sont présentés à la figure 3.5.

Les souris ayant servi à la RNase protection ne pouvaient pas être utilisées pour la reproduction puisqu'elles devaient être sacrifiées pour la récolte des macrophages. L'objectif du *Southern Blot* était donc de vérifier si les patrons obtenus avec l'ADN des reproducteurs potentiels de la F1 de chaque lignée étaient comparables aux patrons des souris de la F1 positives pour la RNase protection sur l'ARN des macrophages. De cette façon, il était possible de vérifier s'il y avait perte de sites d'intégration d'une génération à l'autre, perte qui aurait pu être associée à une abolition ou à une diminution de l'expression de l'ARN messager dans les macrophages. En effet, pour une lignée qui n'a pas été conservée pour les expériences subséquentes, deux patrons de *Southern Blot* étaient obtenus parmi la progéniture F1. Une RNase protection a démontré que l'un d'eux était associé à l'expression de l'ARN messager par les macrophages, alors que l'autre ne l'était pas (Figure 3.6A et B).

Ainsi, les reproducteurs potentiels ont été testé par Southrn Blot et comparés aux souris dont les macrophages exprimaient le transgène. Les patrons obtenus sont présentés à la figure 3.7. Pour les souris SR-A, les sites d'intégration ne sont pas perdus pour toutes les lignées jusqu'à la F4. Les souris PHOX ne sont pas encore à la F4 mais à la F2. De la même façon, les lignées PHOX A et PHOX B ne semblent pas avoir perdu de sites d'intégration. Il est à noter que les lignées ont été perpétuées seulement quand le patron obtenu au *Southern Blot* prouvait que les sites d'intégration étaient conservés entre les générations, et qu'à la F4 il n'y a pratiquement plus de chances que des sites d'intégration multiples se séparent.

Les résultats de ce *Southern Blot* mettent en évidence qu'un patron différent pour les sites d'intégration d'un transgène pour des souris d'une même lignée peut être associé à un phénotype différent. Ils démontrent également que les lignées produites et sélectionnées

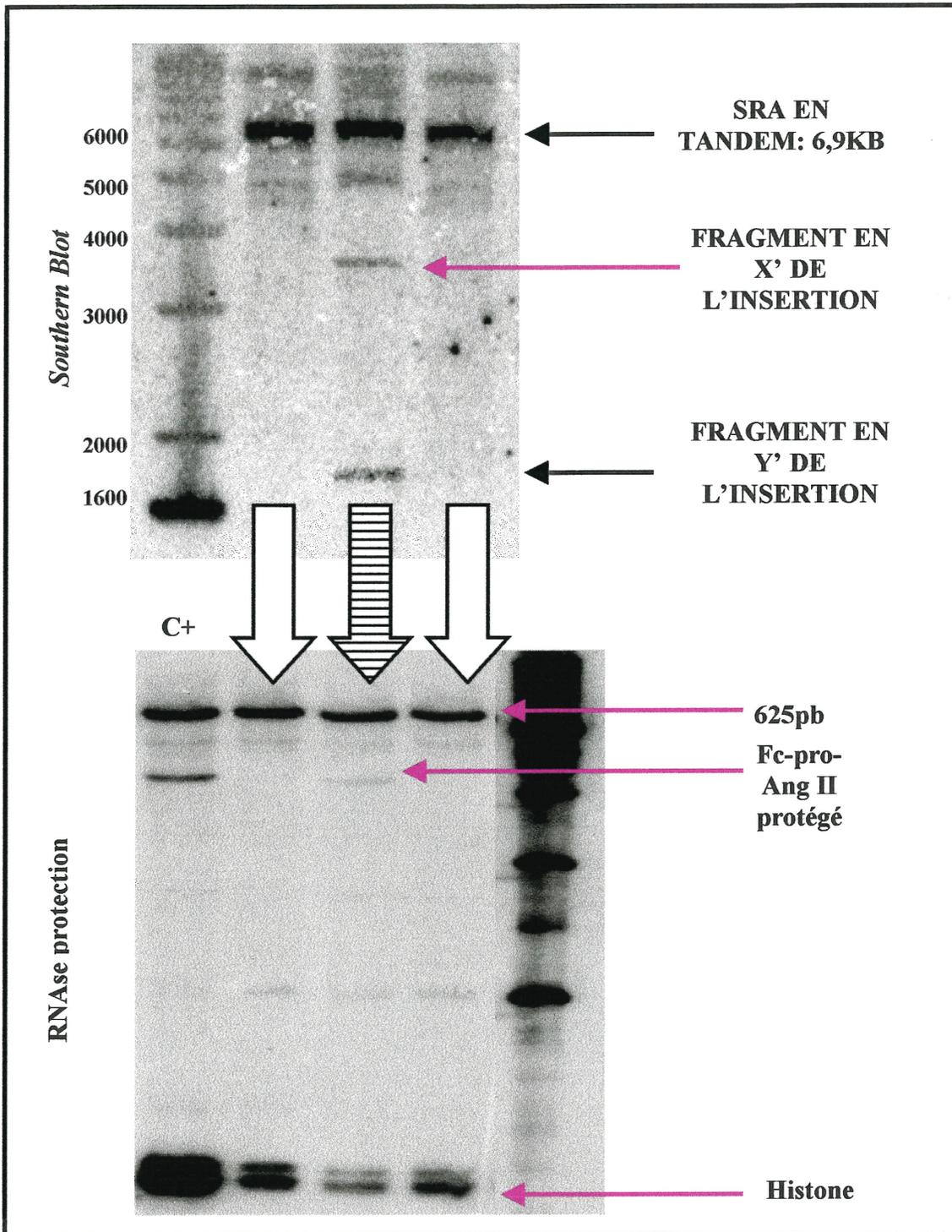
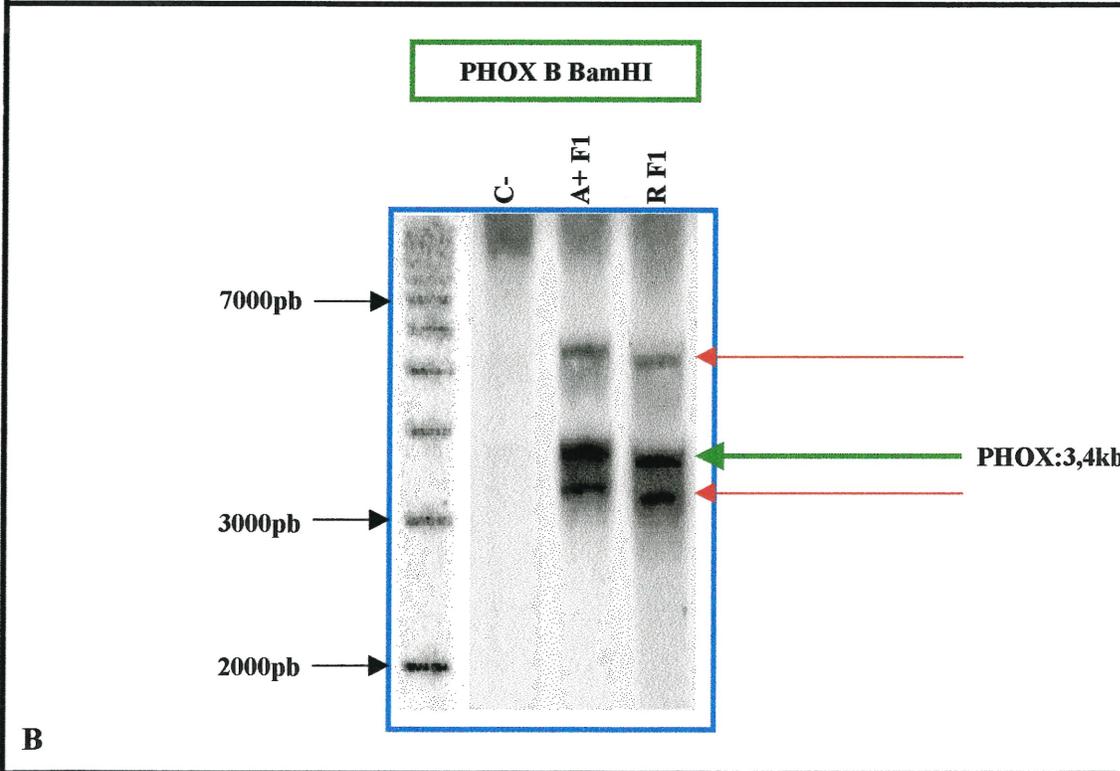
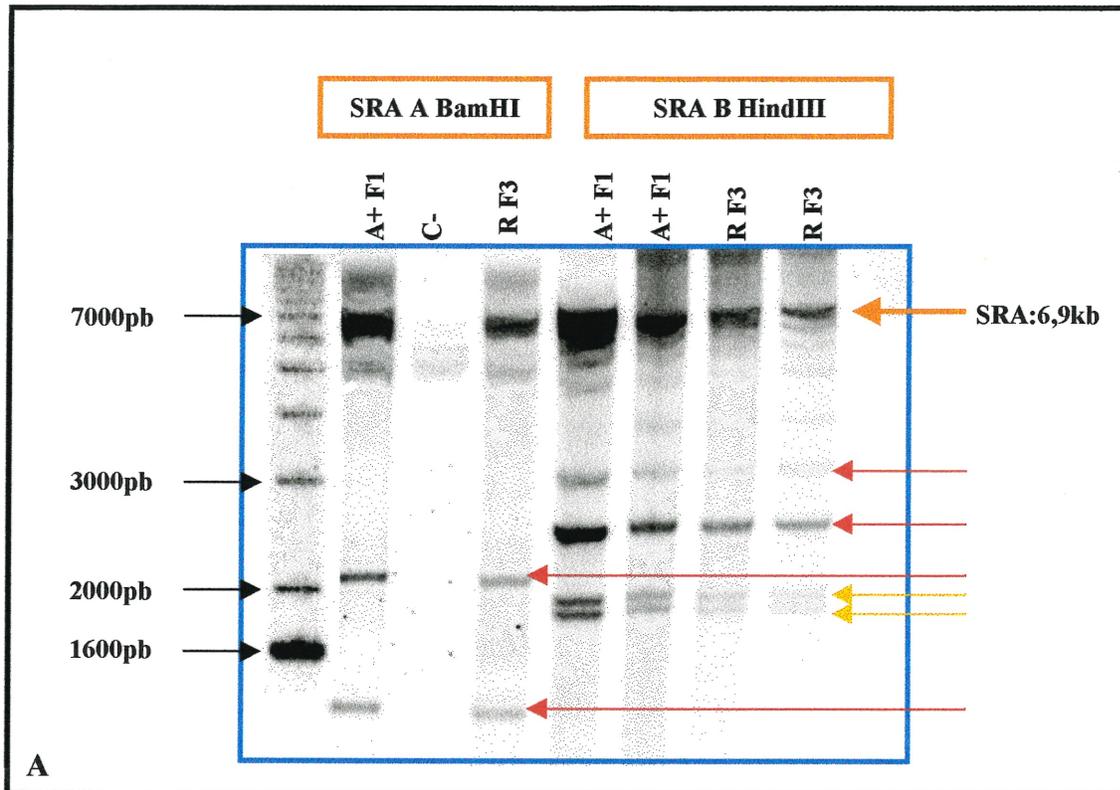


Figure 3.6 : Comparaison entre les patrons de *Southern Blot* et l'expression du transgène pour des souris de même lignée. Il est possible de remarquer que la souris qui exprime l'ARNm dans les macrophages (fragment à 425pb) a un patron de *Southern Blot* différent de celui des souris qui n'expriment pas le transgène.



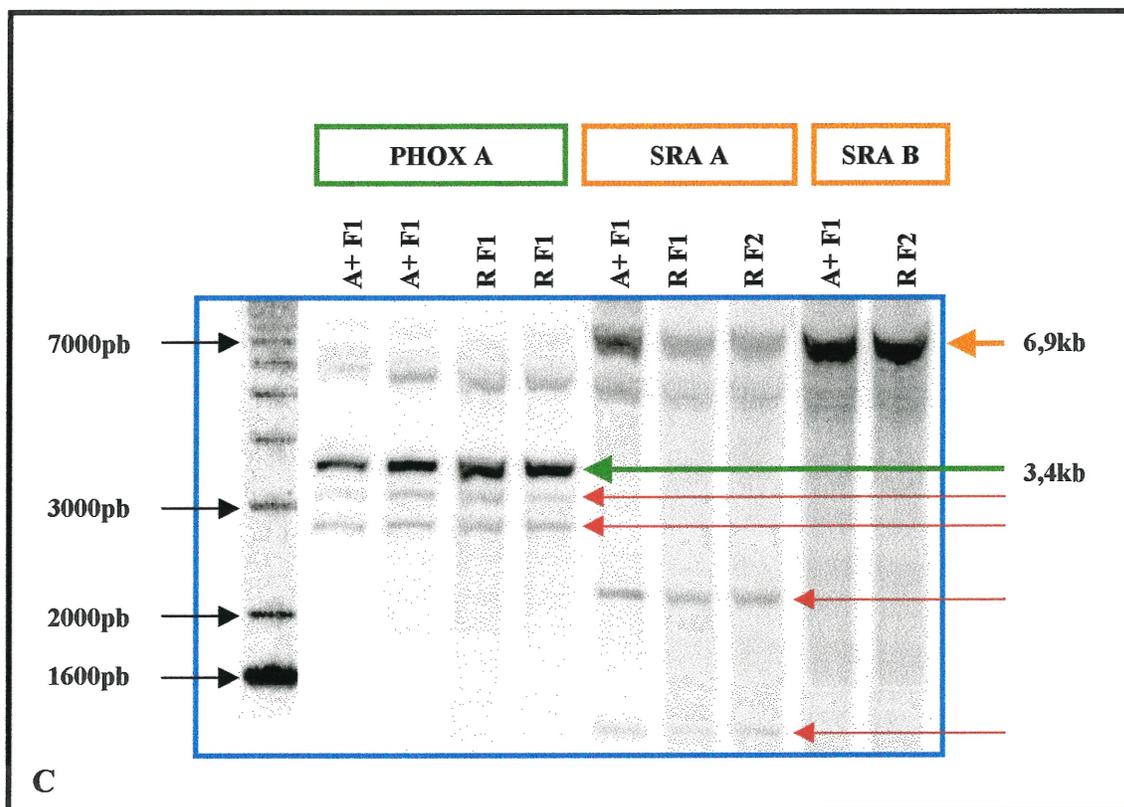


Figure 3.7 : Suivi des lignées par Southern Blot. Les flèches orangées indiquent le fragment de 6,9kb correspondant à la distance entre deux sites de restriction au sein de la répétition en tandem du transgène SRA-Fc-pro-Ang II-Hgh-tail. Les flèches vertes indiquent la même chose pour le transgène gp91-PHOX-Fc-pro-Ang II- β -globine et la distance entre deux sites est de 3,4kb. Pour les lignées où un seul site est présent, des flèches rouges indiquent les fragments obtenus en amont et en aval des sites d'insertion. Des flèches jaunes sont utilisées lorsqu'un site d'intégration supplémentaire apparaît. En A et en B, les enzymes de restrictions utilisées pour la digestion de l'ADN génomique sont indiquées. C : BamHI est utilisé pour tous les échantillons. A+ : ADN d'un animal positif pour l'expression du transgène par les macrophages; C- : ADN d'un animal non-transgénique; R : ADN d'un reproducteur potentiel; FX : génération. Les enzymes de restriction utilisées dans chaque cas sont indiquées.

pour les expériences subséquentes ne changent pas de patron d'une génération à l'autre, même pour la lignée PHOX A qui possède deux sites d'intégration.

3.5. Détection de l'ANG II produite par les macrophages des souris transgéniques.

La lignée ayant le plus niveau d'expression au niveau de l'ARN messenger, PHOX A, a été utilisée afin de mesurer l'Ang II soit dans le liquide intrapéritonéal ou dans les macrophages récoltés. Dans les deux cas, une quantité d'Ang II de 125 pg a été ajoutée à des échantillons de liquide intrapéritonéal et à des échantillons de macrophages provenant de souris contrôle (souris non-transgéniques de la même portée). Il n'a pas été possible de détecter l'Ang II, ni dans les cellules, ni dans le liquide de la cavité des souris transgéniques, bien que la lignée employée démontre une forte expression au niveau de l'ARN messenger. Les contrôles positifs ont permis de détecter 45,6% de l'Ang II qui avait été introduite dans les échantillons de liquide intrapéritonéal, et 21,6% de la quantité introduite dans les échantillons de cellules (Figure 3.8).

En conclusion, la libération d'Ang II par les macrophages transgéniques n'a pas été confirmée ni infirmée.

3.6. Vérification de la spécificité d'expression du transgène.

Les tissus de souris transgéniques exprimant l'Ang II dans leurs macrophages ont été récoltés et leur ARN isolé. En effet, bien que les promoteurs utilisés aient été caractérisés au niveau de la spécificité d'expression aux macrophages (SR-A), et aux macrophages/monocytes (PHOX), il est important de vérifier si dans le modèle développé, cette spécificité est également observée. Or, l'expression a été détectée dans le cœur, le rein et le poumon (Figure 3.9 et 3.12). La source potentielle de cette expression tissulaire sera discutée au chapitre suivant. La spécificité des promoteurs utilisés lors de ce projet n'est toutefois pas confirmée.

3.7. Quantification des macrophages dans les tissus par RNase protection.

Afin de quantifier les macrophages dans les tissus, et de comparer la quantité présente chez les animaux transgéniques versus chez les animaux contrôle, une stratégie basée sur

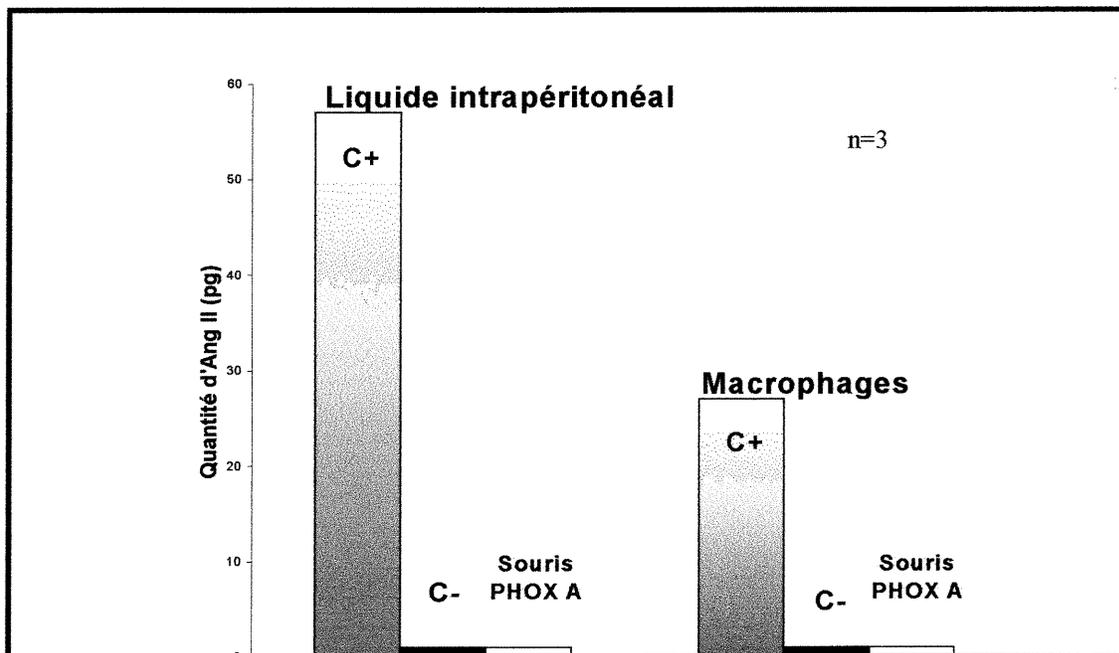


Figure 3.8 : Détection de l'Ang II des macrophages transgéniques par RIA. Les contrôles négatifs (C-) sont des souris non-transgéniques de même portée. Les contrôles positifs (C+) sont des souris non-transgéniques de même portée pour lesquelles 125pg d'Ang II ont été ajoutés après la séparation des cellules et du liquide intrapéritonéal, avant la purification des échantillons. Souris PHOX A : souris transgénique de la lignée qui exprime le plus haut niveau d'ARN messager Fc-pro-Ang II- β -globine. Le contenu en Ang II a été mesuré par RIA et l'Ang II utilisé pour les contrôles positifs provient de la même source que pour la courbe standard qui a permis le dosage.

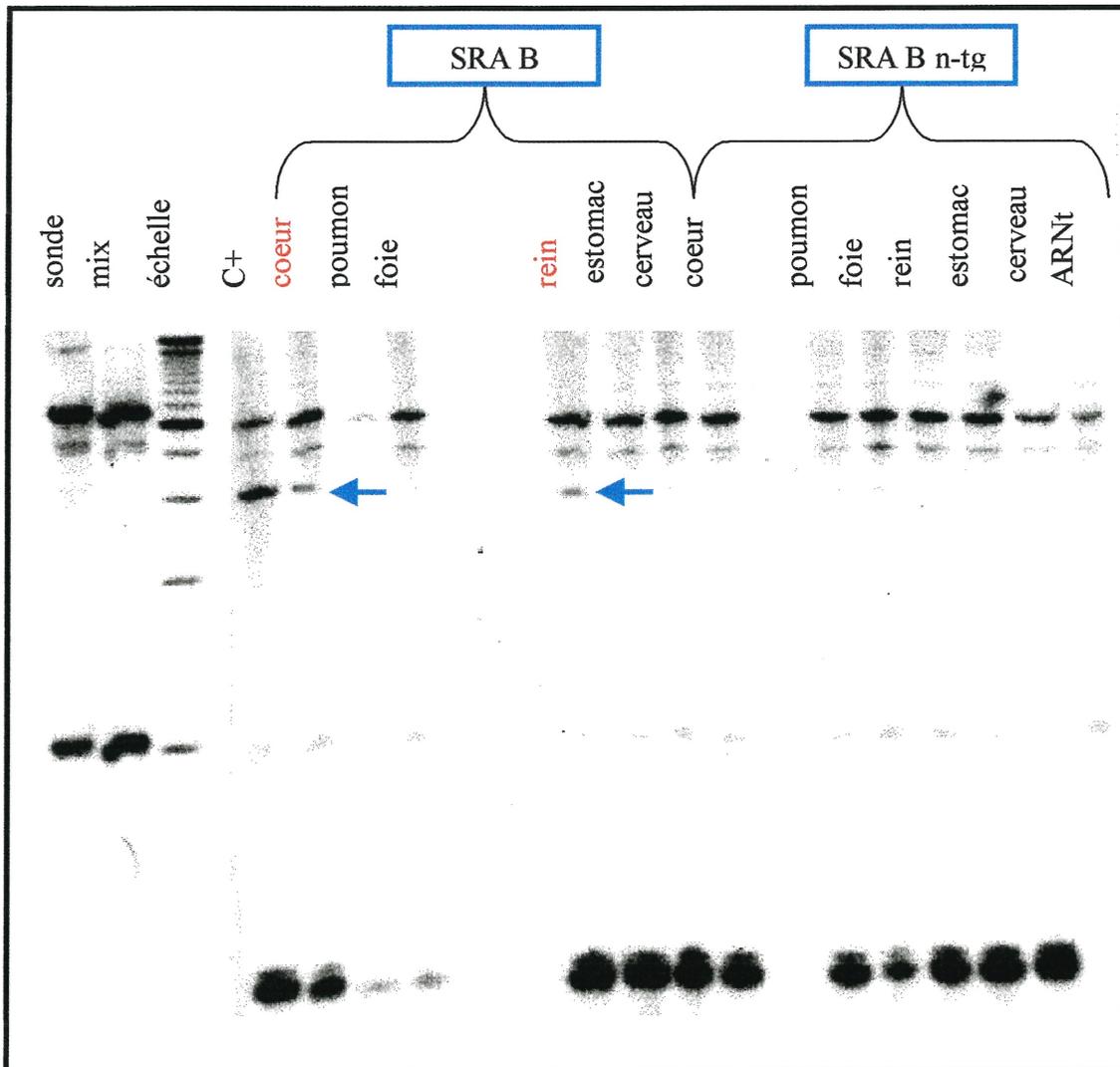


Figure 3.9 : Distribution tissulaire de l'expression du transgène. Les tubes sonde et mix contiennent les sondes histone et Fc-pro-Ang II non digérées et montrent qu'elles sont en excès. Le fragment protégé pour Fc-pro-Ang II apparaît pour le cœur et le rein (fragments protégés à 425pb indiqués par des flèches bleues). Le contrôle positif est fait avec de l'ARN de cellules GH4 transfectées avec une construction permettant l'expression du transgène Fc-pro-Ang II sous la dépendance du promoteur RSV.

la quantitativité de la RNase protection a été développée. Il suffisait de trouver un gène dont l'expression était macrophage-spécifique, d'en cloner un fragment, et de le placer dans un vecteur permettant la production d'une sonde d'ARN radioactive utilisable pour une RNase protection sur l'ARN des tissus des animaux transgéniques et des animaux contrôle. En comparant avec l'intensité de la bande contrôle histone, qui provient de l'ARN total de l'organe en question, à la bande obtenue pour le gène dont l'expression est spécifique aux macrophages, il serait possible de comparer quantitativement les animaux transgéniques et les animaux contrôle quant à la proportion que représente l'ARN de macrophages sur l'ARN total par organe. Un survol de la littérature a permis d'identifier le gène F4/80 comme un candidat intéressant, puisque cette glycoprotéine de surface s'est révélée avoir une distribution spécifique aux macrophages et qu'elle est exprimée chez tous les macrophages, peu importe leur localisation ou leur degré d'activation (McKnight et al., 1996).

Ainsi, 300 pb du dernier exon de ce gène ont été clonées. Par *BLAST*, il a été possible de s'assurer que le fragment choisi pour le clonage ne chevauchait pas deux exons différents. (Figure 3.10). Des oligonucléotides ont été conçus afin de cloner le fragment choisi dans de l'ADN de souris C57BL/6, fond génétique vers lequel la progéniture tendait de plus en plus au fil des générations. Ce fragment a été intégré à un plasmide permettant la synthèse d'une sonde d'ARN radioactive grâce à la polymérase T3 (Figure 2.4). Le séquençage a démontré que le clonage a été efficace.

Une RNase protection a été effectuée sur de l'ARN de macrophages afin de vérifier si le fragment cloné permettait bien la synthèse d'une sonde de la bonne longueur (450 pb) et la protection d'un fragment de la bonne taille également (350 pb). La Figure 3.11 démontre que le fragment de longueur totale ainsi que le fragment protégé ont les bonnes tailles (450 pb et 350 pb respectivement). Elle met aussi en évidence que l'intensité du fragment protégé de la sonde F4/80 est supérieure à l'intensité obtenue avec la sonde histone.

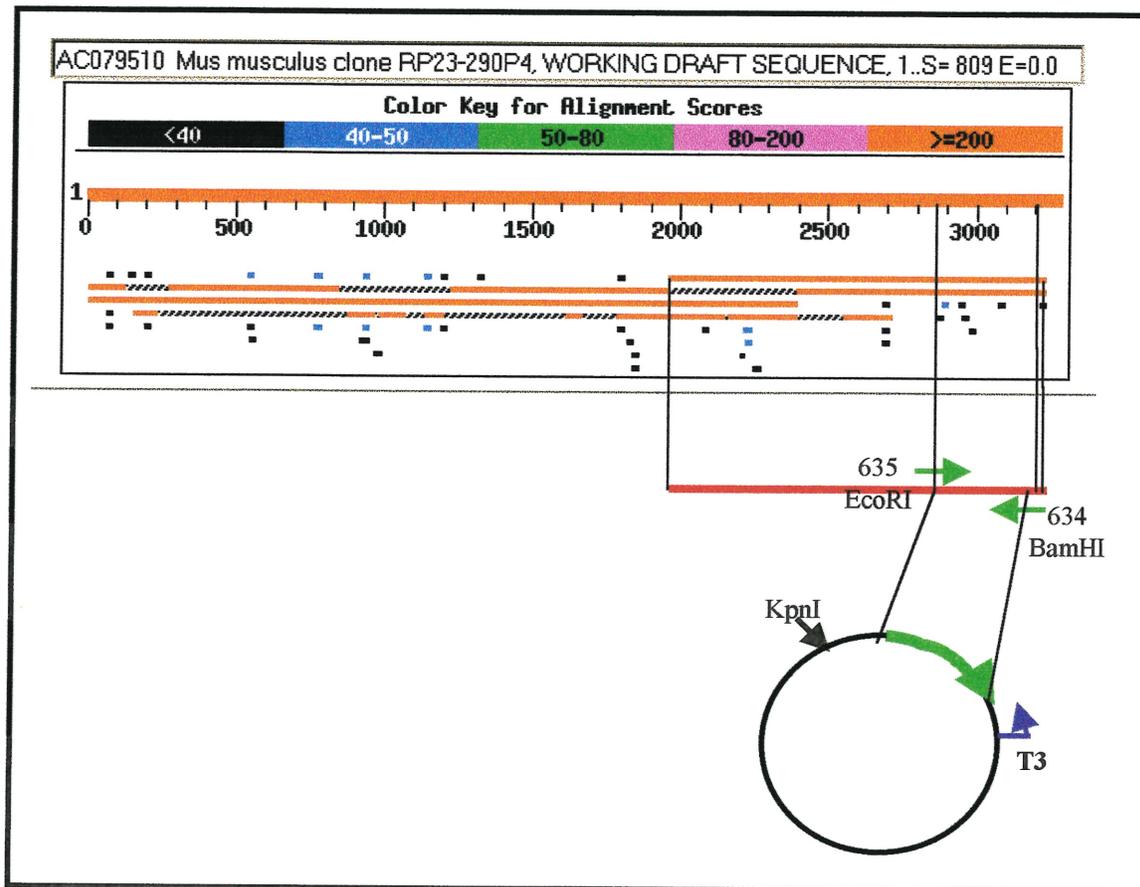


Figure 3.10 : Clonage du gène F4/80 macrophage-spécifique. Choix des régions clonées de 348pb du dernier exon de F4/80 dans un vecteur permettant la synthèse d'une sonde d'ARN antisens à l'ARNm. Le clone d'ADN génomique RP23-290P4 a été choisi car son pourcentage d'identité avec l'ARN messenger est de 100%. 634 : cgggatccatttctggaacaccacaa; 635 : cggaattcgggtaacatcctttctt.

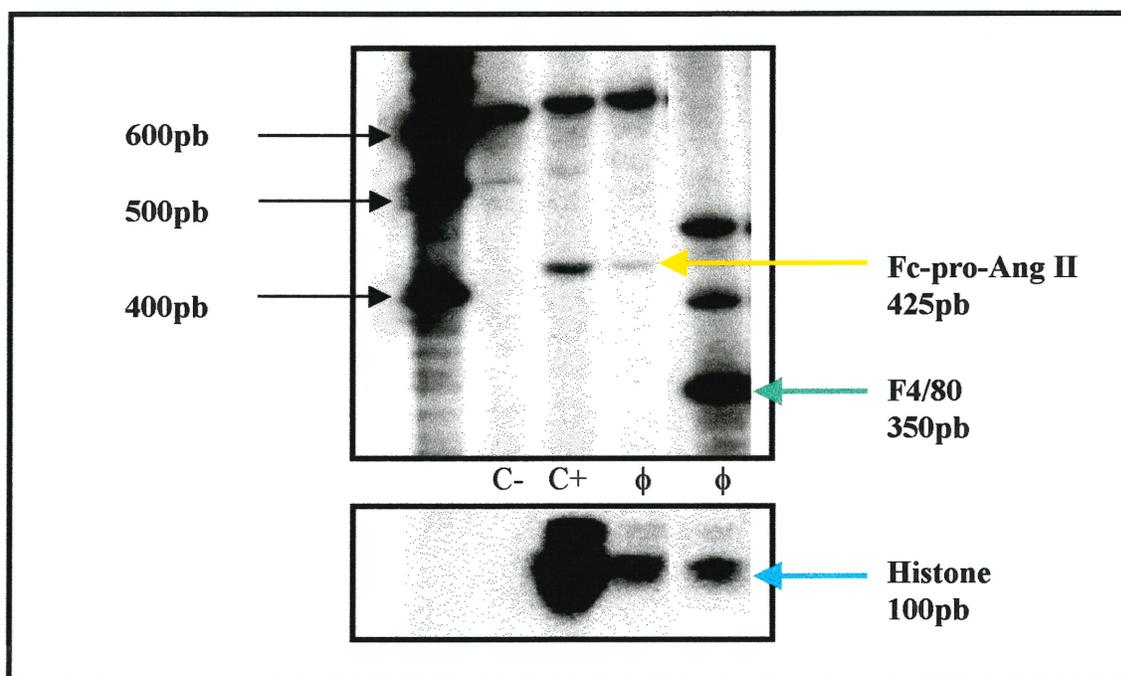


Figure 3.11 : Vérification du niveau d'expression du gène F4/80 dans les macrophages par RNase protection. Les sondes utilisées pour cette RNase protection sont celles illustrées à la figure 3.6. Le fragment apparaissant à 350pb correspond au fragment complémentaire à l'ARNm de F4/80; il est protégé de la digestion aux RNases.

Dans une deuxième série d'expériences, les conditions ont été mises au point afin de permettre une RNase protection à trois sondes, Fc-pro-Ang II, F4/80, et histone. Des mélanges de seulement deux sondes ont été faits pour faciliter la visibilité des bandes sur le gel (F4/80 versus histone et Fc-pro-Ang II versus histone). La Figure 3.12 montre les résultats obtenus suite à ces mises en conditions. Encore une fois, le transgène est exprimé dans des tissus autres que les cellules ciblées, notamment dans le rein (Figure 3.9), le cœur et le poumon (Figure 3.12) pour la lignée SR-A B, puis dans le rein et le cœur pour la lignée SR-A A. La bande obtenue pour le fragment protégé par l'ARN F4/80 dans les tissus est très faible, mais il est toutefois possible de remarquer qu'il n'y a pas de différence notable entre son intensité pour les animaux transgéniques versus les animaux contrôle. La figure 3.12B illustre le changement de ratio entre l'intensité des bandes pour le transgène et pour F4/80 dans les tissus versus dans la cavité péritonéale.

En résumé, le segment de 348pb cloné dans le dernier exon du gène F4/80 dont l'expression est spécifique aux macrophages, lorsqu'il est inséré dans un vecteur approprié (Figure 2.4), permet la synthèse d'une sonde de 450 pb. Le fragment protégé par l'ARN messenger du gène F4/80 a la longueur attendue, soit 350 pb. Aucune différence significative n'a été observée entre l'expression de l'ARN messenger F4/80 chez les souris transgéniques versus souris contrôle, pour un tissu donné. Par rapport, à F4/80, le transgène serait exprimé plus fortement dans les tissus que dans la cavité péritonéale.

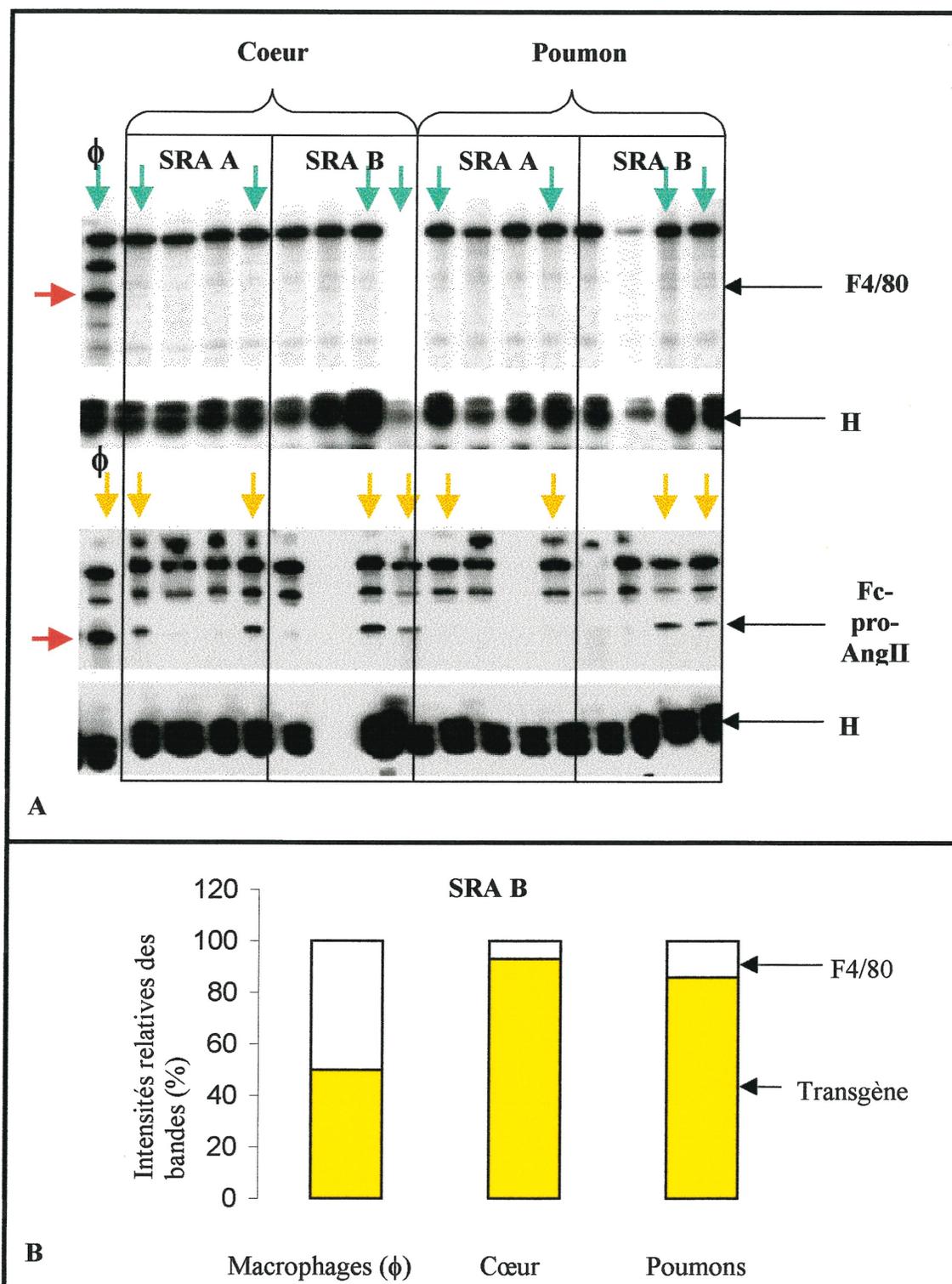


Figure 3.12 : F4/80 comme marqueur de la présence de macrophages dans les tissus par RNase protection. A : La section du haut montre la RNase protection effectuée avec les sondes histone (H) et F4/80. Les flèches vertes montrent les animaux transgéniques alors que les puits n'étant pas pointés par des flèches correspondent aux contrôles non-transgéniques de mêmes portées. La bande pointée d'une flèche rouge

dans la section supérieure correspond au fragment protégé de 350pb B qui démontre la présence de l'ARNm pour F4/80. Cette bande est très intense dans les macrophages (ϕ), alors qu'elle est très faible dans les tissus. Aussi, l'intensité de cette bande ne varie pas de façon significative entre les animaux transgéniques versus contrôles. En A dans la section inférieure, la RNase protection est effectuée avec la sonde histone (H) et la sonde Fc-pro-Ang II. Les flèches jaunes indiquent les animaux transgéniques. La plus forte expression est observée dans les macrophages, mais il y a également de l'expression du transgène dans le cœur des animaux SRA A et dans le cœur et les poumons de la lignée SRA B. B: Niveaux d'intensité relative du transgène par rapport à F4/80 dans les macrophages, le cœur et les poumons.

4. CHAPITRE IV: DISCUSSION ET CONCLUSIONS

4.1. Applications potentielles du modèle développé.

Après nombre d'études visant à déterminer de quelle façon l'Ang II influence l'athérosclérose, le sujet demeure litigieux. En effet, plusieurs des données obtenues *in vitro* démontrent que ce peptide agit directement sur les récepteurs AT1 de différentes cellules dont la participation au processus athérosclérotique est connue (cellules musculaires lisses, cellules endothéliales, monocytes et macrophages). Cette stimulation des récepteurs AT1 agit sur l'expression ou l'activité de molécules en grande partie d'adhésion ou chémotactiques. Ces molécules pourraient accentuer l'athérosclérose lorsque leur expression est augmentée ou lorsqu'elles sont activées. L'oxydation des LDLs est également augmentée par l'Ang II, ainsi que la capture de ceux-ci par les macrophages. Dans la phase d'initiation de l'athérosclérose (phase que concerne le projet de recherche effectué), les processus les plus sujets à subir l'influence de l'Ang II sont l'adhésion des monocytes à la paroi; leur migration à travers l'endothélium; l'oxydation et l'acétylation des LDLs et l'accumulation de macrophages sous forme de cellules spumeuses (Tableau II).

Il est également intéressant de remarquer que toutes les composantes du RAS se trouvent dans l'espace subendothélial, suggérant qu'une production locale d'Ang II est possible. Une libération systémique du peptide ne serait donc pas essentielle à l'augmentation de l'Ang II à proximité des cellules impliquées dans la formation de lésions. Des sujets normotendus dont les niveaux plasmatiques d'Ang II sont normaux pourraient avoir un RAS subendothélial activé. La génération d'Ang II par ce RAS tissulaire pourrait contribuer à la sévérité de leur athérosclérose. Le modèle développé lors de ce projet implique la création d'un RAS subendothélial synthétique activé, qui permet d'évaluer le rôle de l'Ang II en absence d'hypertension.

Plusieurs modèles expérimentaux ont déjà été développés à cette fin, mais leurs résultats demeurent contradictoires. D'une part, certains d'entre eux impliquent l'administration systémique d'Ang II par injection. Or, une augmentation de la pression systémique est

observée pour plusieurs d'entre elles, ce qui ne permet pas de bien délimiter le rôle direct de l'Ang II de son rôle indirect via sa fonction vasopressive. Aussi, même si parfois des doses subpressives sont employées, de légères élévations de la pression non-mesurables par les techniques employées peuvent être engendrées. Ces expériences n'imitent pas non plus un RAS subendothélial activé, puisque l'Ang II est disponible dans le compartiment luminal des vaisseaux et donc plus sujet à moduler la pression systémique.

D'autres modèles impliquent l'utilisation de drogues qui bloquent la production de l'Ang II ou qui inhibent les récepteurs AT₁. Bon nombre de ces études sont réalisées chez des sujets normotendus, mais certaines d'entre elles démontrent que la réduction de l'athérosclérose est observée seulement quand les doses de drogues utilisées réduisent la pression sanguine sous la normale.

Ainsi, le modèle développé lors de ce projet permettrait une meilleure simulation de l'activation du RAS vasculaire subendothélial et une évaluation plus juste des effets causés directement par l'Ang II sur le comportement invasif des macrophages, par l'action du peptide sur les récepteurs AT₁ (ou AT₂) de différentes cellules impliquées dans le développement des lésions. Des lignées dont la pression artérielle est normale devront être identifiées.

4.2. Libération d'Ang II par les macrophages : vérification de la présence de la furine.

Tel que présenté dans la section 1.3.1, la biosynthèse de l'Ang II nécessite plusieurs étapes, et des molécules codées par plusieurs gènes différents sont impliquées dans celle-ci (Figure 1.2). Ainsi, le ciblage de l'expression de l'Ang II à un type particulier de cellules requiert l'utilisation d'une protéine de fusion développée dans le laboratoire présentée à la figure 2.2 (Methot et al., 1997). Rappelons simplement que cette protéine doit être clivée par la furine pour que les cellules qui l'expriment libèrent l'Ang II. Or, bien que la furine soit considérée comme une enzyme ubiquitaire, sa distribution, et plus particulièrement sa présence dans les macrophages, est très peu documentée.

Comme l'expression devait être ciblée aux macrophages du modèle transgénique développé, le premier objectif du présent projet de recherche était de vérifier la présence de furine dans des macrophages en culture. À cette fin, deux stratégies ont été développées, impliquant toutes deux la transfection de cellules j774. Les deux stratégies permettaient de vérifier non seulement sa présence, mais également sa capacité à cliver une protéine de fusion dotée d'un site furine.

Une transfection de macrophages j774 avec la construction permettant l'expression de la protéine de fusion illustrée à la figure 2.2 permet la relâche d'Ang II si la furine est présente. Un RIA utilisant des anticorps anti-Ang II permettait de la détecter (van Kats et al., 2001). Or, ni dans les cellules ni dans les surnageants l'Ang II a pu être détectée. Pour les surnageants et les contenus cellulaires, des contrôles positifs étaient effectués pour mesurer les pertes d'Ang II encourues lors du processus de purification des extraits précédant le RIA. Environ 30% de la quantité initiale d'Ang II introduite était détectée pour les contrôles positifs, alors qu'aucune Ang II n'était détectée dans le cas des cellules transfectées. Il est possible que l'efficacité de transfection soit en cause, puisqu'il est connu que les macrophages sont relativement difficiles à transférer. Aussi, la demi-vie de l'Ang II n'étant que de 30 minutes, il est possible qu'elle ait été dégradée durant la préparation des échantillons pour le RIA. Cette hypothèse est supportée par les pertes de 70% observées dans le cas des contrôles positifs.

La seconde stratégie développée dans le laboratoire permet d'augmenter la sensibilité de la détection de la furine dans les cellules transfectées, puisqu'elle comporte une réaction enzymatique. La figure 3.1 illustre la stratégie employée. Si la furine est présente dans les cellules transfectées avec prorénine-furine, la rénine active est libérée. Son activité est mesurée et témoigne de la présence de furine dans les cellules utilisées. Le contrôle négatif effectué pour valider cette technique consiste à effectuer la transfection avec la prorénine native, pour vérifier si elle est clivée et activée dans les macrophages malgré l'absence du site furine (figure 3.1 B). Les résultats obtenus démontrent que seulement la prorénine-furine est activée dans les macrophages. Les macrophages contiennent donc la furine. D'ailleurs, toute la prorénine-furine relâchée dans le surnageant et clivée, puisque

l'activité totale des extraits n'excède par celle de la rénine provenant du clivage par la furine (figure 3.1 C).

4.3. Transgénèse et identification des souris positives par PCR.

Deux modèles transgéniques ont été développés. Le premier visait la libération d'Ang II par les macrophages uniquement. L'Ang II serait donc relâché dans l'espace subendothélial et elle pourrait agir de façon autocrine ou paracrine. Il a été démontré par des études *in vitro* que l'Ang II augmente l'expression de molécules d'adhésion et chimiotactiques. Il est également connu que le comportement invasif des monocytes et macrophages est influencé par l'expression de molécules d'adhésion et chimiotactiques par les cellules endothéliales, les macrophages/monocytes, et des cellules musculaires lisses.

Le deuxième modèle ciblait l'expression de la protéine de fusion aux macrophages et aux monocytes. Il serait ainsi possible de vérifier l'effet obtenu quand l'Ang II est disponible pour les monocytes avant qu'ils pénètrent la paroi. Pour séparer les effets directs des effets indirects de l'Ang II, il serait impératif de vérifier que ces souris transgéniques ont une pression systémique normale.

Afin de cibler la libération d'Ang II aux macrophages, des régions promotrices du gène SR-A humain ont été utilisées. Le plasmide Pal-I contenant 291 pb du promoteur proximal du récepteur SR-A, et 400 pb de l'élément activateur en amont de ce promoteur, a été fourni par le Dr Christopher K. Glass. Son équipe a caractérisé cette région promotrice en identifiant la séquence minimale requise pour cibler l'expression de l'hormone de croissance humaine aux macrophages et aux cellules spumeuses des lésions de souris athérosclérotiques (Horvai et al., 1995). Les séquences promotrices et les éléments *enhancer* du promoteur contiennent des sites de liaison pour PU.1, AP-1 et les facteurs de transcription des domaines ets. Ils ont réussi à obtenir une expression spécifique, démontrant par RNase protection avec une sonde antisens que le gène rapporteur n'était pas exprimé dans les tissus des souris transgéniques. La séquence codant pour la protéine de fusion a été insérée dans le plasmide en question entre les

régions promotrices et la séquence codant pour la queue poly A de l'hormone de croissance humaine (destinée à assurer une bonne stabilité à l'ARNm).

Pour le ciblage aux macrophages et aux monocytes, le promoteur gp91-PHOX a été fourni par Dr Stuart H. Orkin. Lui et son équipe ont caractérisé les régions promotrices requises pour un ciblage de l'expression exclusivement aux macrophages et aux monocytes chez la souris transgénique, se situant entre -1541 pb et +1 (Skalnik et al., 1991). Cette région du promoteur a été clonée dans un plasmide en amont de la séquence codant pour Fc-pro-Ang II et de la queue poly A de la β -globine.

La transgénèse a donné de très bons résultats, générant plus de 30% de souris transgéniques pour le total des ovules micro-injectés. Ceci a été vérifié par PCR. Les amorces utilisées ont été dessinées entre des régions de la protéine de fusion provenant de différents gènes, de façon à rendre impossible l'amplification de séquences endogènes (figure 3.2). Les souris fondatrices positives ont été croisées avec des souris C57BL/6. Cette souche a été choisie pour sa susceptibilité à développer des lésions d'athérosclérose lorsqu'elle suit une diète riche en lipides.

4.4. Vérification de l'expression du transgène par les macrophages.

Des individus de la F1 ont été testés de façon à déterminer les niveaux d'expression du transgène dans les macrophages. La technique employée pour le recrutement des macrophages permet un enrichissement en macrophages de 90% dans la cavité péritonéale après une stimulation au thioglycollate (Skalnik et al., 1991). Il suffit de récolter les cellules 4 ou 5 jours suivant l'injection intrapéritonéale de la solution de thioglycollate (Figure 3.3A et B). Afin de s'assurer de la qualité des ARNs isolés, ils étaient placés sur gel et révélés au bromure d'éthidium. Il a été noté que l'ARN de macrophage est plus sensible à la dégradation que les ARNs des autres tissus, probablement du à la présence de nucléases en grande quantité. Les conditions expérimentales ont donc du être raffinées pour en arriver à la qualité illustrée à la figure 3.3C. L'ARN est considéré de bonne qualité quand l'intensité obtenue pour la bande correspondant à l'ARNr 28S est de 1,5 fois l'intensité de celle obtenue pour l'ARN 18S.

La quantité d'ARN obtenue était limitante (50 µg), ne permettant d'effectuer que 4-5 protections à la RNase.

Une protection à la RNase avec sonde d'ARN antisens aux ARNm produit à partir du transgène a permis d'identifier deux lignées SR-A et deux lignées PHOX dont les macrophages exprimaient le transgènes à des degrés différents (Figure 3.4A). La sonde étant en excès par rapport aux ARNm, et l'ARN d'histone servant de contrôle pour la quantité d'ARN utilisée lors du test, les résultats pouvaient être comparés entre eux quantitativement. Les niveaux relatifs d'expressions sont illustrés à la figure 3.4B. Il est possible de conclure que les promoteurs SR-A et PHOX permettent l'expression d'un ARNm chez les macrophages des souris transgéniques.

4.5. Suivi des lignées par *Southern Blot*.

Un Southern Blot a été développé pour le suivi des lignées. En effet, il était important de s'assurer que le nombre de sites d'intégration du transgène dans le génome ne variait pas au cours des croisements. La figure 3.5 illustre deux des situations possibles, soit un seul site ou deux sites d'intégration, pour les souris SRA et pour les souris PHOX. La figure 3.6 démontre que des patrons de *Southern Blot* différents pour des animaux d'une même ligné peuvent être associés à une différence de phénotype par rapport à l'expression du transgène, ce qui justifie l'utilisation du *Southern blot* afin de croiser les lignées qui ont le phénotype intéressant.

La figure 3.7 illustre la comparaison des patrons de *Southern Blot* des souris au phénotype recherché (expression du transgène par les macrophages) avec les patrons de reproducteurs potentiels. La reproduction avait lieu seulement si les patrons étaient identiques. (Figure 3.7A; B; C). À la figure 3.7 A, il est possible d'observer quatre bandes supplémentaires à la bande principale pour les souris SR-A B. Le transgène se serait donc inséré à deux endroits dans le génome. Toutes ces bandes sont toujours présentes à la F3, mais il sera quand même important de suivre l'évolution du patron dans les générations ultérieures. Si ces deux sites ne se séparent jamais avec les croisements, c'est qu'ils sont situés sur le même chromosome et assez près l'un de l'autre pour que les

événements de recombinaison n'aient pas la possibilité de les séparer. Toutes les autres lignées, SR-A A, PHOX A et PHOX B, n'ont qu'un seul site d'intégration et leur patron de *Southern Blot* ne varie pas entre les générations.

4.6. RIA : libération de l'Ang II par les macrophages.

Le contenu en Ang II du liquide péritonéal des souris transgéniques de la lignée ayant la plus forte expression a été mesuré 4 jours après stimulation au thioglycollate. Le contenu cellulaire des macrophages a été testé également. Il n'a pas été possible de détecter l'Ang II. Pour les contrôles positifs, 125 pg d'Ang II étaient ajoutés avant le traitement des échantillons. Pour le liquide péritonéal, 45,6% de cette quantité pouvait être mesurée par RIA. Pour les cellules, seulement 21,6% étaient détectés. Ainsi l'Ang II produit par les macrophages peut avoir été dégradé ou simplement ne pas être libéré par la cellule. En effet, l'Ang II peut être dégradée par des aminopeptidases et carboxypeptidases (Ardaillou, 1997; Wolf et al., 1997). Aussi, il est connu que les macrophages expriment plusieurs aminopeptidases et qu'ils en sécrètent davantage lorsqu'ils sont recrutés dans la cavité péritonéale grâce au thioglycollate (Miller et al., 1994; Soderling et Knuutila, 1980; Wachsmuth et Wust, 1982). Cependant, van Katz et al. (van Kats et al., 2001) ont démontré qu'un cœur perfusé de souris transgéniques exprimant la protéine de fusion Fc-pro-AngII libéraient le peptide. Afin de vérifier si les macrophages en sont aussi capables, il serait possible d'effectuer un *cell blot assay*, qui permet de détecter l'Ang II libéré par une cellule individuelle. Cet essai diminue le risque de dégradation puisque les cellules sont attachées à une membrane à laquelle le peptide se lie de façon covalente lorsqu'il est relâché. La révélation se fait grâce à des anticorps anti-Ang II (Fischer et al., 1997).

4.7. Vérification de la spécificité de l'expression du transgène.

Après avoir vérifié que les macrophages exprimaient bien le transgène, comme dans la plupart des études de transgéniques, la spécificité du promoteur SR-A a été évaluée. Une RNase protection a été effectuée sur l'ARN de plusieurs tissus (Figure 3.9). Il n'y a pas d'expression ectopique dans le cerveau, dans l'estomac et dans le foie. Dans le rein (Figure 3.12) le cœur et les poumons (Figure 3.9), l'ARNm Fc-pro-Ang II- β -globine est

déecté. Cependant, il est impossible de savoir, par ce résultat, si le promoteur est spécifique des macrophages. En effet, l'expression observée peut venir des cellules des tissus, mais également de macrophages présents dans ceux-ci. Si elle provient des macrophages, la valeur du modèle expérimental serait accrue car cela démontrerait que les macrophages expriment le transgène non seulement lorsqu'ils sont recrutés dans la cavité péritonéale par le thioglycollate, mais également dans un contexte tissulaire normal. Par contre, si l'expression provient des cellules cardiaques et des cellules de reins, le promoteur n'est pas spécifique. Les études qui caractérisaient ces promoteurs chez la souris transgénique démontraient pourtant leur spécificité (Horvai et al., 1995) (Skalnik et al., 1991). Ainsi, si le promoteur n'est pas spécifique dans le cas présent, ce pourrait être du aux sites d'intégration dans le génome ou à la nature du transgène exprimé, qui apportent peut-être des sites de liaison pour des facteurs de transcription supplémentaires qui permettent l'expression dans d'autres types de cellules que les macrophages. Aussi, les lignées de souris utilisées lors de ces études diffèrent de celle utilisée pour le présent projet de recherche. Certaines variations génétiques peuvent donner lieu à une distribution différente de l'expression d'un gène régulé par le même promoteur, si les cellules ciblées possèdent des facteurs de transcription différents. Une hybridation *in situ*, combinée à une immunohistochimie avec des anti F4/80, permettrait de savoir si l'expression provient des macrophages des tissus ou si elle est réellement ectopique.

Si l'expression est ectopique, il serait possible de développer une nouvelle stratégie qui permettrait d'utiliser le modèle développé pour vérifier les effets directs de l'Ang II sur le comportement invasif des macrophages. La moelle osseuse des souris transgéniques pourrait être greffée à des souris apoE $-/-$ irradiées. La moelle de cette souris pourrait être reconstituée avec 50% de cellules souches transgéniques et 50% de cellules souches de type sauvage. Une souche de souris receveuse dont les marqueurs de surface Th diffèrent de ceux de la souche donneuse serait utilisée. Il serait possible de vérifier - par immunohistochimie contre les Th spécifiques des macrophages transgéniques - si ces derniers sont plus invasifs que les macrophages de type sauvage.

4.8. Clonage de F4/80 et Test RNase sur ARNs de macrophages.

Une RNase protection visant la quantification des macrophages dans les tissus a été développée afin d'évaluer la modulation du comportement invasif des macrophages. Le gène F4/80 dont l'expression est macrophage-spécifique (McKnight et al., 1996), a été cloné. Comme seulement la séquence de l'ARNm n'étant disponible dans la banque de données *Genbank* de *NCBI*, un *BLAST* a été effectué pour la comparer aux séquences d'ADN répertoriées et pour y positionner les introns et les exons. Les amorces de PCR ont été dessinées dans un seul exon (Figure 3.10). En effet, si les amorces sont choisies sur deux exons différents ou sur un intron, la séquence qu'elles amplifieront ne sera pas entièrement complémentaire à celle de l'ARNm correspondant au transgène. La RNase pourrait alors avoir accès, lors de la digestion, à des portions simple brin au sein de la portion qui devrait normalement être protégée. Une RNase protection sur l'ARN de macrophages a démontré que les longueurs totale et protégée de la sonde étaient les bonnes. Il n'y avait donc pas de différences de séquence entre l'ADN de C57BL/6 cloné et la séquence de l'ARN messager isolé des macrophages de souris transgéniques (dont le fond génétique n'est pas 100% C57BL/6).

4.9. Quantification des macrophages par RNase protection avec la sonde F4/80.

Une RNase protection a ensuite été effectuée sur les ARNs de tissus de souris transgéniques versus non-transgéniques afin de vérifier si une plus grande quantité de macrophages étaient présents dans les tissus des animaux transgéniques. Il était possible de quantifier les macrophages de cette façon puisqu'il est rapporté que tous les macrophages expriment F4/80, peu importe leur degré d'activation (McKnight et al., 1996). Les ratios F4/80 (macrophage-spécifique) sur histone (exprimé par toutes les cellules) peuvent être comparés entre les souris transgénique et type sauvage. Si le ratio est plus élevé chez les souris transgéniques, il y a plus de macrophages dans leurs tissus que dans les tissus des souris contrôle. De très faibles niveaux ont été obtenus pour F4/80 dans les différents tissus, et il a été impossible d'observer une modulation de leur comportement invasif de cette façon. Il est possible que leur comportement invasif n'ait pas été influencé, bien que l'ARNm du transgène soit détecté au niveau des tissus, si l'Ang II n'est pas libérée par les macrophages. Le *cell blot assay* sera donc nécessaire

pour garantir que l'Ang II atteint sa cible. Si c'est le cas et que la quantité de macrophages dans les tissus demeure inchangée, cela signifiera que l'Ang II à elle seule n'est pas suffisante à influencer la migration des macrophages chez un animal bien portant.

Cependant, la méthode développée pourrait être utile dans le cas d'animaux qui sont sujets à une invasion massive de macrophages dans la paroi de leurs vaisseaux, comme les souris apoE $-/-$ soumises à une diète riche en lipides. Les souris transgéniques SR-A et PHOX pourront être croisées à des souris apoE $-/-$, et le comportement invasif de leurs macrophages pourra être mesuré. La sensibilité du test serait peut-être suffisante lorsque le phénotype est plus sévère. Par rapport à l'immunohistochimie, cette RNase protection est beaucoup plus rapide et objective pour la quantification des macrophages dans les tissus. Aussi, l'évolution des plaques d'athérosclérose des souris apoE $-/-$ SR-A et PHOX pourrait être suivie dans le temps et il serait possible de vérifier si la libération d'Ang II par les macrophages accélère et/ou accentue leur sévérité.

Les résultats obtenus sont tout de même intéressants. Il faut rappeler que 100% des macrophages expriment F4/80, et qu'une proportion de ceux-ci exprime le transgène. La figure 3.12B illustre les ratios de l'intensité des bandes obtenues pour le transgène par rapport à F4/80 dans le cœur, le poumon, et les macrophages de la cavité intrapéritonéale. Ce ratio est fortement augmenté dans les tissus par rapport aux macrophages de la cavité. Cette modification des niveaux relatifs d'expression peut être expliquée de deux façons. D'abord, le transgène est peut-être exprimé dans les cellules des tissus. Ces cellules n'expriment pas F4/80, donc le ratio Tg sur F4/80 est augmenté. Cette hypothèse devra être vérifiée, comme il a été mentionné plus haut, par hybridation *in situ* couplée à une immunohistochimie avec anti-F4/80. Si l'expression du transgène est révélée dans des cellules négatives pour le marquage aux anticorps spécifiques des macrophages, le promoteur n'est pas spécifique. Dans ce cas, le modèle ne pourrait pas être utilisé directement. Dans ce cas, un transfert de moelle osseuse tel que décrit à la section 4.7 devrait être effectué.

Par contre, si le promoteur s'avère spécifique, ce changement de ratio pourrait être expliqué de la façon suivante. L'Ang II produite par les macrophages transgéniques de la cavité péritonéale est probablement diluée par rapport à celle produite par les macrophages dans l'espace subendothélial dans les tissus. L'Ang II dans les tissus serait donc plus à même de se lier aux récepteurs AT1 des macrophages adjacents. Or, il est connu que l'Ang II, en agissant sur les récepteurs AT1 des macrophages, active les facteurs de transcription AP-1 et Ets (dont PU.1) par la voie de Rho A/Rho-kinase (Takeda et al., 2001). Comme les éléments de liaison pour ces facteurs sont présents au sein des régions du promoteur SR-A utilisées, l'Ang II peut activer l'expression du transgène dans une boucle de rétroaction positive. Aussi, le promoteur SR-A est connu pour son activation qui suit le degré de différenciation des macrophages, qui sont à leur état le plus différencié en présence d'inflammation (de Winther et al., 2000). Or, l'Ang II active plusieurs gènes proinflammatoires. Tous ces éléments suggèrent ensemble que l'Ang II pourrait être responsable de l'augmentation de du ratio transgène sur F4/80 au niveau de l'ARNm dans les tissus.

4.10. Conclusions et perspectives futures.

En conclusion, le projet de recherche a permis de confirmer la présence de furine dans les macrophages et de démontrer sa capacité à cliver une protéine de fusion dotée d'un site furine. Les promoteurs SR-A et PHOX ont permis l'expression des transgènes Fc-pro-Ang II-Hgh-tail et Fc-pro-Ang II- β -globine respectivement, par les macrophages des souris transgéniques. La relâche du peptide par les macrophages n'a pas été confirmée. Elle pourrait l'être par un *cell blot assay* spécifique pour l'Ang II, méthode qui pallie la dégradation du peptide. L'expression du transgène observée au niveau des reins, des poumons et du cœur des animaux transgéniques met en doute la spécificité des promoteurs utilisés. L'hybridation *in situ* couplée à une immunohistochimie avec des anticorps anti-F4/80 permettra de vérifier si l'expression provient des macrophages présents dans les tissus. Si c'est le cas, cela signifiera que dans les tissus, une plus grande proportion de la population de macrophages expriment le transgène que dans la population recueillie dans la cavité péritonéale ou que le niveau d'expression du transgène est augmenté. L'hypothèse proposée est que l'Ang II serait plus disponible

pour les cellules dans l'espace subendothélial que dans la cavité péritonéale. Elle agirait sur l'expression du transgène par une boucle de rétroaction positive sur l'expression du transgène Fc-pro Ang II via les éléments AP-1 et Ets. D'autre part, la sonde produite à partir du dernier exon de F4/80 permet bien la détection de l'ARN messager F4/80 des macrophages. De faibles niveaux sont observés dans les tissus. Contrairement à l'hypothèse proposée, ces niveaux ne varient pas entre les animaux transgéniques et les animaux contrôle. Cependant il est impossible de conclure avec les résultats obtenus à propos du rôle direct de l'Ang II sur le comportement invasif des macrophages. Le peptide ne semble pas influencer ce processus dans le modèle développé, mais une caractérisation plus approfondie de ce modèle sera nécessaire afin de vérifier la relâche du peptide par la cellule. Si les promoteurs sont spécifiques et si l'Ang II est relâchée par les macrophages, alors il sera possible de conclure que l'Ang II n'affecte pas le comportement invasif des macrophages chez un animal bien portant. Il serait alors intéressant de croiser les souris transgéniques à des souris apoE -/- et de les soumettre à une diète riche en lipides. L'évolution de l'athérosclérose pourrait être suivie en terme de rapidité et de sévérité, et il serait possible de vérifier l'effet de l'Ang II sur le développement des plaques chez un animal athérosclérotique. D'autre part, même si les promoteurs ne se révèlent pas spécifiques, les cellules de moelle osseuse des animaux transgéniques pourront être transférées à des animaux contrôles apoE -/- (Linton et al., 1995) en proportions variables avec des cellules de moelle osseuse de type sauvage. Si la composition des plaques a un pourcentage de macrophages transgénique supérieur au pourcentage introduit, cela signifierait que les macrophages transgéniques sont plus invasifs que les macrophages de type sauvage. Le modèle développé permettra donc l'avancement des connaissances par rapport au rôle direct de l'Ang II dans l'athérogénèse.

LISTE DE RÉFÉRENCES

- Aberg, G. et Ferrer, P. (1990). Effects of captopril on atherosclerosis in cynomolgus monkeys. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* *15*, S65-72.
- Ardailou, R. (1997). Active fragments of angiotensin II: enzymatic pathways of synthesis and biological effects. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* *6*, 28-34.
- Behr-Roussel, D., Rupin, A., Simonet, S., Bonhomme, E., Coumailleau, S., Cordi, A., Serkiz, B., Fabiani, J.N., et Verbeuren, T.J. (2000). Effect of chronic treatment with the inducible nitric oxide synthase inhibitor N-iminoethyl-L-lysine or with L-arginine on progression of coronary and aortic atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits. *Circulation* *102*, 1033-1038.
- Benoit, P., Emmanuel, F., Caillaud, J.M., Bassinet, L., Castro, G., Gallix, P., Fruchart, J.C., Branellec, D., Deneffe, P., et Duverger, N. (1999). Somatic gene transfer of human ApoA-I inhibits atherosclerosis progression in mouse models. *Circulation* *99*, 105-110.
- Berk, B.C. et Corson, M.A. (1997). Angiotensin II signal transduction in vascular smooth muscle: role of tyrosine kinases. *Circ. Res.* *80*, 607-616.
- Boisvert, W.A., Santiago, R., Curtiss, L.K., et Terkeltaub, R.A. (1998). A leukocyte homologue of the IL-8 receptor CXCR-2 mediates the accumulation of macrophages in atherosclerotic lesions of LDL receptor-deficient mice. *J. Clin. Invest* *101*, 353-363.
- Bondjers, G., Glukhova, M., Hansson, G.K., Postnov, Y.V., Reidy, M.A., et Schwartz, S.M. (1991). Hypertension and atherosclerosis. Cause and effect, or two effects with one unknown cause? *Circulation* *84*, VI2-16.
- Boring, L., Gosling, J., Cleary, M., et Charo, I.F. (1998). Decreased lesion formation in CCR2^{-/-} mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature* *394*, 894-897.
- Braun-Menendez, E., Fasciolo, J.C., Leloir, L.F., et Munoz, J.M. (1939). La substancia hipertensora de la sangre del rinon isquimiado. *Rev. Soc. Argent. Biol.* *15*, 420-425.
- Brown, G.P., et Douglas, J.G. (1992). Angiotensin II binding sites in isolated rat renal brush border membranes. *Endocrinology* *111*, 830-836.
- Brown, G.P., et Douglas, J.G. (1983). Angiotensin II binding sites in rat and primate isolated renal tubular basolateral membranes. *Endocrinology* *112*, 2007-2014.
- Campbell, D.J. (1987). Circulating and tissue angiotensin systems. *J. Clin. Invest.* *79*, 1-6.
- Capers, Q., Alexander, R.W., Lou, P., De Leon, H., Wilcox, J.N., Ishizaka, N., Howard, A.B., et Taylor, W.R. (1997). Monocyte chemoattractant protein-1 expression in aortic tissues of hypertensive rats. *Hypertension* *30*, 1397-1402.

- Chawla, A., Boisvert, W. A., Lee, C. H., Laffitte, B. A., Barak, Y., Joseph, S. B., Liao, D., Nagy, L., Edwards, P. A., Curtiss, L. K., Evans, R. M., et Tontonoz, P. (2001). A PPAR gamma-LXR-ABCA1 pathway in macrophages is involved in cholesterol efflux and atherogenesis. *Mol. Cell* 7, 161-171.
- Chen, H. J., Li, D. Y., Saldeen, T., Phillips, M. I., et Mehta, J. L. (2001). Attenuation of tissue P-selectin and MCP-1 expression and intimal proliferation by AT(1) receptor blockade in hyperlipidemic rabbits. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 282, 474-479.
- Chen, X. L., Tummala, P. E., Olbrych, M. T., Alexander, R. W., et Medford, R. M. (1998). Angiotensin II induces monocyte chemoattractant protein-1 gene expression in rat vascular smooth muscle cells. *Circ. Res.* 83, 952-959.
- Chobanian, A. V., Haudenschild, C. C., Nickerson, C., et Drago, R. (1990). Antiatherogenic effect of captopril in the Watanabe heritable hyperlipidemic rabbit. *Hypertension* 15, 327-331.
- Chobanian, A. V., Haudenschild, C. C., Nickerson, C., et Hope, S. (1992). Trandolapril inhibits atherosclerosis in the Watanabe heritable hyperlipidemic rabbit. *Hypertension* 20, 473-477.
- Chobanian, A. V., Lichtenstein, A. H., Nilakhe, V., Haudenschild, C. C., Drago, R., et Nickerson, C. (1989). Influence of hypertension on aortic atherosclerosis in the Watanabe rabbit. *Hypertension* 14, 203-209.
- Chung, O., Kuhl, H., Stoll, M., et Unger, T. (1998). Physiological and pharmacological implications of AT₁ versus AT₂ receptors. *Kidney. Int.* 54, S95-S99.
- Churchill, P. C. First and second messengers in renin secretion. (1995). In: Laragh, J. H., Brenner, B. M., eds. *Hypertension: pathophysiology, diagnosis, and management*. 2nd ed. New York: Raven Press, 1869-1895.
- Collins, R. G., Velji, R., Guevara, N. V., Hicks, M. J., Chan, L., et Beaudet, A. L. (2000). P-Selectin or intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 deficiency substantially protects against atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *J. Exp. Med.* 191, 189-194.
- Cybulsky, M. I. et Gimbrone, M. A., Jr. (1991). Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science* 251, 788-791.
- Cyrus, T., Witztum, J. L., Rader, D. J., Tangirala, R., Fazio, S., Linton, M. F., et Funk, C. D. (1999). Disruption of the 12/15-lipoxygenase gene diminishes atherosclerosis in apo E-deficient mice. *J. Clin. Invest* 103, 1597-1604.
- Davies, M. J., Richardson, P. D., Woolf, N., Katz, D. R., et Mann, J. (1993). Risk of thrombosis in human atherosclerotic plaques: role of extracellular lipid, macrophage, and smooth muscle cell content. *Br. Heart J.* 69, 377-381.

- Davis, J.O. (1975). Regulation of aldosterone secretion. In: Blasko, H., Sayers, H., Smith, A.D., eds. *Handbook of physiology: adrenal physiology*. Washington: American physiological society, 77-106.
- de Winther, M.P., van Dijk, K.W., Havekes, L.M., et Hofker, M.H. (2000). Macrophage scavenger receptor class A: A multifunctional receptor in atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20, 290-297.
- Detmers, P.A., Hernandez, M., Mudgett, J., Hassing, H., Burton, C., Mundt, S., Chun, S., Fletcher, D., Card, D.J., Lisnock, J., Weikel, R., Bergstrom, J.D., Shevell, D.E., Hermanowski-Vosatka, A., Sparrow, C.P., Chao, Y.S., Rader, D.J., Wright, S.D., et Pure, E. (2000). Deficiency in inducible nitric oxide synthase results in reduced atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *J. Immunol.* 165, 3430-3435.
- DiBonna, G.F. (1985). Neural regulation of renal tubular sodium reabsorption and renin secretion. *Fed. Proc.* 44, 2816-2822.
- DiBonna, G.F., et Kopp, U.C. (1997). Neural control of renal function. *Physiol. Rev.* 77, 75-197.
- Diet, F., Pratt, R.E., Berry, G.J., Momose, N., Gibbons, G.H., et Dzau, V.J. (1996). Increased accumulation of tissue ACE in human atherosclerotic coronary artery disease. *Circulation* 94, 2756-2767.
- Dol, F., Martin, G., Staels, B., Mares, A.M., Cazaubon, C., Nisato, D., Bidouard, J.P., Janiak, P., Schaeffer, P., et Herbert, J.M. (2001). Angiotensin AT1 receptor antagonist irbesartan decreases lesion size, chemokine expression, and macrophage accumulation in apolipoprotein e-deficient mice. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 38, 395-405.
- Dong, Z.M., Chapman, S.M., Brown, A.A., Frenette, P.S., Hynes, R.O., et Wagner, D.D. (1998). The combined role of P- and E-selectins in atherosclerosis. *J. Clin. Invest* 102, 145-152.
- Douglas, B.H., Langford, J.G., et McCaa, R.E. (1979). Response of mineralocorticoid hypertensive animals to AI converting enzyme inhibitor. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 161, 86-87.
- Douglas, J.G., et Hopfer, U. (1994). Novel aspect of angiotensin receptors and signal transduction in the kidney. *Annu. Rev. Physiol.* 56, 649-669.
- Dzau, V.J. (1988). Circulating versus local renin-angiotensin system in cardiovascular homeostasis. *Circulation* 77, 14-13.
- Edwards, R.M., et Aiyar, N. (1993). Angiotensin II receptor subtypes in the kidney cortex. *J. Am. Soc. Nephrol.* 3, 1643-1652.
- Febbraio, M., Podrez, E.A., Smith, J.D., Hajjar, D.P., Hazen, S.L., Hoff, H.F., Sharma, K., et Silverstein, R.L. (2000). Targeted disruption of the class B scavenger receptor CD36

protects against atherosclerotic lesion development in mice. *J. Clin. Invest* 105, 1049-1056.

Field,L.J., McGowan,R.A., Dickinson,D.P., et Gross,K.W. (1984). Tissue and gene specificity of mouse renin expression. *Hypertension* 6, 597-603.

Fischer,T.A., Ungureanu-Longrois,D., Singh,K., de Zengotita,J., DeUgarte,D., Alali,A., Gadbut,A.P., Lee,M.A., Balligand,J.L., Kifor,I., Smith,T.W., et Kelly,R.A. (1997). Regulation of bFGF expression and ANG II secretion in cardiac myocytes and microvascular endothelial cells. *Am. J. Physiol* 272, H958-H968.

Fitzsimons,J.T. (1980). Angiotensin stimulation of the central nervous system. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 87, 118-146.

Fitzsimons,J.T. (1998). Angiotensin, thirst, and sodium appetite. *Physiol. Rev.* 78, 583-686.

Fray,J.C.S., Park,C.S., et Valentine,A.N.D. (1987). Calcium and the control of renin secretion. *Endocrinol. Rev.* 8, 530-93.

Freeman,R.H., et Davis,J.O. (1983). Factors controlling renin secretion and metabolism. In: Genest,J., Kyckel,O., Hamet,P, et Cantin, M., éds. *Hypertension*. New York: McGraw-Hill, 225-250.

Freeman,R.H., Davis,J.O., et Villareal,D. (1984). Role of the renal prostaglandins in the control of renin secretion. *Circ. Res.* 54, 1-9.

Fukuhara,M., Geary,R.L., Diz,D.I., Gallagher,P.E., Wilson,J.A., Glazier,S.S., Dean,R.H., et Ferrario,C.M. (2000). Angiotensin-converting enzyme expression in human carotid artery atherosclerosis. *Hypertension* 35, 353-359.

Funakoshi,Y., Ichiki,T., Shimokawa,H., Egashira,K., Takeda,K., Kaibuchi,K., Takeya,M., Yoshimura,T., et Takeshita,A. (2001). Rho-kinase mediates angiotensin II-induced monocyte chemoattractant protein-1 expression in rat vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 38, 100-104.

Getz,G.S. (1990). The involvement of lipoproteins in atherogenesis. Evolving concepts. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 598, 17-28.

Glass,C.K. et Witztum,J.L. (2001). Atherosclerosis. The road ahead. *Cell* 104, 503-516.

Goldstein,J.L. et Brown,M.S. (1977). The low-density lipoprotein pathway and its relation to atherosclerosis. *Annu. Rev. Biochem.* 46:897-930.

Gould,L.A., Rossouw,J.E., Santanello,N.C., Heyse,J.F., et Furberg,C.D. (1998). Cholesterol reduction yields benefit: Impact of statins trials. *Circulation* 97, 946-952.

Gosling, J., Slaymaker, S., Gu, L., Tseng, S., Zlot, C.H., Young, S.G., Rollins, B.J., et Charo, I.F. (1999). MCP-1 deficiency reduces susceptibility to atherosclerosis in mice that overexpress human apolipoprotein B. *J. Clin. Invest.* *103*, 773-778.

Griendling, K.K. et Alexander, R.W. (1997). Oxidative stress and cardiovascular disease. *Circulation* *96*, 3264-3265.

Griendling, K.K., Tsuda, T., Berk, B.C., et Alexander, R.W. (1989). Angiotensin II stimulation of vascular smooth muscle. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* *14*, S27-S33.

Griendling, K.K., Ushio-Fukai, M., Lassegue, B., et Alexander, R.W. (1997). Angiotensin II signaling in vascular smooth muscle. New concepts. *Hypertension* *29*, 366-373.

Gu, L., Okada, Y., Clinton, S.K., Gerard, C., Sukhova, G.K., Libby, P., et Rollins, B.J. (1998). Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice. *Molec. Cell. Biol.* *2*, 275-281.

Gupta, S., Pablo, A.M., Jiang, X., Wang, N., Tall, A.R., et Schindler, C. (1997). IFN-gamma potentiates atherosclerosis in ApoE knock-out mice. *J. Clin. Invest.* *99*, 2752-2761.

Hall, J.E. (1986). Control of sodium excretion by angiotensin II: intrarenal mechanism and blood pressure regulation. *Am. J. Physiol.* *250*, R960-R972.

Hall, J.E., et Brands, M.W. (2000). The renin-angiotensin-aldosterone systems: renal mechanisms and circulatory homeostasis. In: Seldin, D.W., Giebisch, G., eds. *The kidney: physiology and pathophysiology*. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1009-1045.

Hall, J.E., Granger, J.P., Hester, R.L., et Montani, J.P. (1986). Mechanisms of sodium balance in hypertension: role of pressure natriuresis. *J. Hypertens.* *4*, S57-S65.

Hall, J.E., Guyton, A.C., et Brands, M.W. (1995). Control of sodium excretion and arterial pressure by intrarenal mechanisms and the renin-angiotensin system. In: Laragh, J.W., Brenner, B.M., eds. *Hypertension: pathophysiology, diagnosis, and management*. New York: Raven Press, 1451-1475.

Hall, J.E., Guyton, A.C., Coleman, T.G., Mizelle, H.L., et Woods, L.L. (1986) Regulation of arterial pressure: role of pressure natriuresis and diuresis. *Fed. Proc.* *45*, 2897-2903.

Harats, D., Shaish, A., George, J., Mulkins, M., Kurihara, H., Levkovitz, H., et Sigal, E. (2000). Overexpression of 15-lipoxygenase in vascular endothelium accelerates early atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *20*, 2100-2105.

Harris,P.J., Thomas,D., et Morgan,T.O. (1987). Atrial natriuretic peptide inhibits angiotensin-stimulated proximal tubular sodium and water reabsorption. *Nature* 326, 697-698.

Hayek,T., Attias,J., Smith,J., Breslow,J.L., et Keidar,S. (1998). Antiatherosclerotic and antioxidative effects of captopril in apolipoprotein E-deficient mice. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 31, 540-544.

Hishikawa,K., Oemar,B.S., Yang,Z., et Luscher,T.F. (1997). Pulsatile stretch stimulates superoxide production and activates nuclear factor-kappa B in human coronary smooth muscle. *Circ. Res.* 81, 797-803.

Hobbs,H.H., Russell,D.W., Brown,M.S., et Goldstein,J.L. (1990). The LDL receptor locus in familial hypercholesterolemia: mutational analysis of a membrane protein. *Annu. Rev. Genet.* 24, 133-170.

Hope,S., Brecher,P., et Chobanian,A.V. (1999). Comparison of the effects of AT1 receptor blockade and angiotensin converting enzyme inhibition on atherosclerosis. *Am. J. Hypertens.* 12, 28-34.

Horkko,S., Binder,C.J., Shaw,P.X., Chang,M.K., Silverman,G., Palinski,W., et Witztum,J.L. (2000). Immunological responses to oxidized LDL. *Free Radic. Biol. Med.* 28, 1771-1779.

Horvai,A., Palinski,W., Wu,H., Moulton,K.S., Kalla,K., et Glass,C.K. (1995). Scavenger receptor A gene regulatory elements target gene expression to macrophages and to foam cells of atherosclerotic lesions. *PNAS* 92, 5391-5395.

Howard,A.B., Alexander,R.W., Nerem,R.M., Griendling,K.K., et Taylor,W.R. (1997). Cyclic strain induces an oxidative stress in endothelial cells. *Am. J. Physiol.* 272, C421-C427.

Husain,A. (1993). The chymase-angiotensin system in humans. *J. Hypertens.* 11, 1155-1159.

Huszar,D., Varban,M.L., Rinninger,F., Feeley,R., Arai,T., Fairchild-Huntress,V., Donovan,M.J., et Tall,A.R. (2000). Increased LDL cholesterol and atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice with attenuated expression of scavenger receptor B1. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20, 1068-1073.

Johns,E.J. (1989). Role of angiotensin II and the sympathetic nervous system in the control of renal function. *J. Hypertens.* 7, 695-701.

Kannel,W.B., Neaton,J.D., Wentworth,D., Thomas,H.E., Stamler,J., Hulley,S.B., et Kjelsberg,M.O. (1986). Overall and coronary heart disease mortality rates in relation to major risk factors in 325,348 men screened for the MRFIT. Multiple Risk Factor Intervention Trial. *Am. Heart J.* 112, 825-836.

Keeton, T.K., et Campbell, W.B. (1980). The pharmacological alteration of renin release. *Pharmacol. Rev.* 32, 81-227.

Keidar, S., Attias, J., Smith, J., Breslow, J.L., et Hayek, T. (1997b). The angiotensin-II receptor antagonist, losartan, inhibits LDL lipid peroxidation and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 236, 622-625.

Keidar, S., Attias, J., Smith, J., Breslow, J.L., et Hayek, T. (1997a). The angiotensin-II receptor antagonist, losartan, inhibits LDL lipid peroxidation and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 236, 622-625.

Kojima, I., Kojima, K., et Rasmussen, H. (1985). Effects of ANGII and K^+ on Ca efflux and aldosterone production in adrenal glomerulosa cells. *Am. J. Physiol.* 248, E36-E43.

Kowala, M.C., Grove, R.I., et Aberg, G. (1994). Inhibitors of angiotensin converting enzyme decrease early atherosclerosis in hyperlipidemic hamsters. Fosinopril reduces plasma cholesterol and captopril inhibits macrophage-foam cell accumulation independently of blood pressure and plasma lipids. *Atherosclerosis* 108, 61-72.

Kozarsky, K.F., Donahee, M.H., Glick, J.M., Krieger, M., et Rader, D.J. (2000). Gene transfer and hepatic overexpression of the HDL receptor SR-BI reduces atherosclerosis in the cholesterol-fed LDL receptor-deficient mouse. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20, 721-727.

Kruth, H.S. (2001). Macrophage foam cells and atherosclerosis. *Front. Biosci.* 6, D429-55.

Kukanskis, K.A., Siddiquee, Z., Shohet, R.V., et Garner, H.R. (2000). Mix of sequencing techniques for sequence closure. *Biotechniques* 28, 630-634.

Laragh, J.H., et Sealey, J.E. (1973). The renin-angiotensin-aldosterone hormonal system and the regulation of sodium, potassium, and blood pressure homeostasis. In: Orloff, J., Berliner, R.W., eds. *Handbook of physiology: section 8, renal physiology*. Washington: American physiological society, 831-908.

Laragh, J.H., et Sealey, J.E. (1982). The vasoconstriction-volume spectrum in normotension and in the pathogenesis of hypertension. *Fed. Proc.* 41, 2415-2423.

Lee, R.T. et Libby, P. (1997). The unstable atheroma. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 17, 1859-1867.

Li, A.C., Brown, K.K., Silvestre, M.J., Willson, T.M., Palinski, W., et Glass, C.K. (2000). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands inhibit development of atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *J. Clin. Invest* 106, 523-531.

Li, D.Y., Zhang, Y.C., Philips, M.I., Sawamura, T., et Mehta, J.L. (1999). Upregulation of endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein (LOX-1) in cultured human

coronary artery endothelial cells by angiotensin II type 1 receptor activation [see comments]. *Circ. Res.* 84, 1043-1049.

Linton, M.F., Atkinson, J.B., et Fazio, S. (1995). Prevention of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice by bone marrow transplantation. *Science* 267, 1034-1037.

Lorenz, J. Weihprecht, H., Schnermann, J., Skott, O., et Briggs, J.P. (1990). Characterisation of the macula densa mechanism for renin secretion. *Am. J. Physiol.* 259, F186-F193.

Lorenz, J. Weihprecht, H., Schnermann, J., Skott, O., et Briggs, J.P. (1991). Renin release from the isolated juxtaglomerular apparatus depends on macula densa Cl transport. *Am. J. Physiol.* 260, F486-F493.

Lutgens, E., Gorelik, L., Daemen, M.J., de Muinck, E.D., Grewal, I.S., Koteliansky, V.E., et Flavell, R.A. (1999). Requirement for CD154 in the progression of atherosclerosis. *Nat. Med.* 5, 1313-1316.

Maack, T., Marion, D.N., Camargo, M.J.F. (1984). Effect of atrial natriuretic factor on blood pressure, renal function, and the renin-aldosterone system in dogs. *Am. J. Med.* 77, 1069-1075.

Mack, K.D., Wei, R., Elbagarri, A., Abbey, N., et McGrath, M.S. (1998). A novel method for DEAE-dextran mediated transfection of adherent primary cultured human macrophages. *J. Immunol. Methods* 211, 79-86.

Makaritsis, K.P., Gavras, H., Du, Y., Chobanian, A.V., et Brecher, P. (1998). Alpha1-adrenergic plus angiotensin receptor blockade reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Hypertension* 32, 1044-1046.

Mallat, Z., Besnard, S., Duriez, M., Deleuze, V., Emmanuel, F., Bureau, M.F., Soubrier, F., Esposito, B., Duez, H., Fievet, C., Staels, B., Duverger, N., Scherman, D., et Tedgui, A. (1999). Protective role of interleukin-10 in atherosclerosis. *Circ. Res.* 85, e17-e24.

Matsusaka, T. et Ichikawa, I. (1997). Biological functions of angiotensin and its receptors. *Annu. Rev. Physiol* 59, 395-412.

McKnight, A.J., Macfarlane, A.J., Dri, P., Turley, L., Willis, A.C., et Gordon, S. (1996). Molecular cloning of F4/80, a murine macrophage-restricted cell surface glycoprotein with homology to the G-protein-linked transmembrane 7 hormone receptor family. *J. Biol. Chem.* 271, 486-489.

Methot D, Reudelhuber TL, et Silversides DW. (1995). Evaluation of tyrosinase minigene co-injection as a marker for genetic manipulations in transgenic mice. *Nucl. Ac. Res* 23, 4551-4556.

Methot,D., LaPointe,M.C., Touyz,R.M., Yang,X.P., Carretero,O.A., Deschepper,C.F., Schiffrin,E.L., Thibault,G., et Reudelhuber,T.L. (1997). Tissue targeting of angiotensin peptides. *J. Biol. Chem.* 272, 12994-12999.

Miller, B.C., Ackroyd, A., Hersh, L.B., et Cottam, G.L. (1994). Methionine enkephalin metabolism by murine macrophage ectopeptidase(s). *Regul.Pept.* 50, 87-98.

Navab,M., Berliner,J.A., Watson,A.D., Hama,S.Y., Territo,M.C., Lusis,A.J., Shih,D.M., Van Lenten,B.J., Frank,J.S., Demer,L.L., Edwards,P.A., et Fogelman,A.M. (1996). The Yin and Yang of oxidation in the development of the fatty streak. A review based on the 1994 George Lyman Duff Memorial Lecture. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 16, 831-842.

Nickenig,G., et Harrison,M.D. (2002). The AT₁- type angiotensin receptor in oxidative stress and atherogenesis. Part II : AT₁ Receptor regulation. *Circulation* 105, 530-536.

Okunishi,H., Miyazaki,M., Okamura,T., et Toda,N. (1987). Different distribution of two types of angiotensin II-generating enzymes in the aortic wall. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 149, 1186-1192.

Page,I.H. et Helmer,O.M. (1940). A crystalline pressor substance (angiotonin) resulting from the reaction between renin and renin activator. *J. Exp. Med.* 71, 29-42.

Paulsson,G., Zhou,X., Tornquist,E., et Hansson,G.K. (2000). Oligoclonal T cell expansions in atherosclerotic lesions of apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20, 10-17.

Pinderski Oslund,L.J., Hedrick,C.C., Olvera,T., Hagenbaugh,A., Territo,M., Berliner,J.A., et Fyfe,A.I. (1999). Interleukin-10 blocks atherosclerotic events in vitro and in vivo. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 19, 2847-2853.

Piqueras,L., Kubes,P., Alvarez,A., O'Connor,E., Issekutz,A.C., Esplugues,J.V., et Sanz,M.J. (2000). Angiotensin II induces leukocyte-endothelial cell interactions in vivo via AT(1) and AT(2) receptor-mediated P-selectin upregulation. *Circulation* 102, 2118-2123.

Quinn,S.J., et William,G.H. (1988). Regulation of aldosterone secretion. *Ann. Rev. Physiol.* 50, 409-426.

Rajagopalan,S., Kurz,S., Munzel,T., Tarpey,M., Freeman,B.A., Griendling,K.K., et Harrison,D.G. (1996). Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone. *J. Clin. Invest* 97, 1916-1923.

Ross,R. (1999). Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N. Engl. J. Med.* 340, 115-126.

- Salazar,F.J., Fiksen-Olsen,M.J., Oppenorth,T.J., Granger,JP., Burnett,J.C. Jr, et Romero,J.C. (1986). Renal effects of ANF without changes in glomerular filtration rate and blood pressure. *Am. J. Physiol.* 251, F532-F536.
- Sambrooke,J., Russel,W.R., et Sambrooke,J. (1988) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York : Fritsch, Manniatis.
- Scheidegger,K.J., Butler,S., et Witztum,J.L. (1997). Angiotensin II increases macrophage-mediated modification of low density lipoprotein via a lipoxygenase-dependent pathway. *J. Biol. Chem.* 272, 21609-21615.
- Schuh,J.R., Blehm,D.J., Frierdich,G.E., McMahon,E.G., et Blaine,E.H. (1993). Differential effects of renin-angiotensin system blockade on atherogenesis in cholesterol-fed rabbits. *J. Clin. Invest* 91, 1453-1458.
- Sealey,J.E., et Laragh,J.H. (1995). The renin-angiotensin-aldosterone system for normal regulation of blood pressure and sodium and potassium homeostasis. In: Laragh,J.H., Brenner,B.M., éds. *Hypertension: pathophysiology, diagnosis, and management*. New York: Raven Press, 1763-1796.
- Seebach,F.A., Welte,T., Fu,X.Y., Block,L.H., et Kashgarian,M. (2001). Differential activation of the STAT pathway by angiotensin II via angiotensin type 1 and type 2 receptors in cultured human fetal mesangial cells. *Exp. Mol. Pathol.* 70, 265-273.
- Shade,R.E., Davis,J.O., Johnson,J.A., Gotshall,R.W., et Spielman,W.S. (1973). Mechanism of action of angiotensin II and antidiuretic hormone on renin secretion. *Am. J. Physiol.* 224, 926-943.
- Shih,P.T., Brennan,M.L., Vora,D.K., Territo,M.C., Strahl,D., Elices,M.J., Lusis,A.J., et Berliner,J.A. (1999). Blocking very late antigen-4 integrin decreases leukocyte entry and fatty streak formation in mice fed an atherogenic diet. *Circ. Res.* 19, 345-351.
- Shimada,K. et Yazaki,Y. (1978). Binding sites for angiotensin II in human mononuclear leucocytes. *J. Biochem. (Tokyo)* 84, 1013-1015.
- Skalnik,D.G., Dorfman,D.M., Perkins,A.S., Jenkins,N.A., Copeland,N.G., et Orkin,S.H. (1991). Targeting of transgene expression to monocyte/macrophages by the gp91-phox promoter and consequent histiocytic malignancies. *PNAS* 88, 8505-8509.
- Skeggs,L.T., Kahn,J.R., et Schumway,N.P. (1956). The preparation and function of the angiotensin-converting enzyme. *J. Exp. Med.* 103, 295-299.
- Smith,J.D., Trogan,E., Ginsberg,M., Grigaux,C., Tian,J., et Miyata,M. (1995). Decreased atherosclerosis in mice deficient in both macrophage colony-stimulating factor (op) and apolipoprotein E. *PNAS* 92, 8264-8268.

Soderling E, et Knuutila, M. (1980). Release of the chloride-dependent arginine aminopeptidase from PMN leukocytes and macrophages during phagocytosis. *Life Sci.* 28, 303-312.

Stamler, J., Neaton, J.D., et Wentworth, D.N. (1989). Blood pressure (systolic and diastolic) and risk of fatal coronary heart disease. *Hypertension* 13, 12-12.

Stary, H.C., Chandler, A.B., Glagov, S., Guyton, J.R., Insull, W., Jr., Rosenfeld, M.E., Schaffer, S.A., Schwartz, C.J., Wagner, W.D., et Wissler, R.W. (1994). A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation* 89, 2462-2478.

Steinberg, D., Parthasarathy, S., Carew, T.E., Khoo, J.C., et Witztum, J.L. (1989). Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N. Engl. J. Med.* 320, 915-924.

Strawn, W.B., Chappell, M.C., Dean, R.H., Kivlighn, S., et Ferrario, C.M. (2000). Inhibition of early atherogenesis by losartan in monkeys with diet-induced hypercholesterolemia. *Circulation* 101, 1586-1593.

Strawn, W.B., Gallagher, P.E., Tallant, E.A., Ganten, D., et Ferrario, C.M. (1999). Angiotensin II AT1-receptor blockade inhibits monocyte activation and adherence in transgenic (mRen2)27 rats. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 33, 341-351.

Suzuki, H., Kurihara, Y., Takeya, M., Kamada, N., Kataoka, M., Jishage, K., Ueda, O., Sakaguchi, H., Higashi, T., Suzuki, T., Takashima, Y., Kawabe, Y., Cynshi, O., Wada, Y., Honda, M., Kurihara, H., Aburatani, H., Doi, T., Matsumoto, A., Azuma, S., Noda, T., Toyoda, Y., Itakura, H., Yazaki, Y., et Kodama, T. (1997). A role for macrophage scavenger receptors in atherosclerosis and susceptibility to infection. *Nature* 20, 292-296.

Takeda, K., Ichiki, T., Tokunou, T., Iino, N., Fujii, S., Kitabatake, A., Shimokawa, H., et Takeshita, A. (2001). Critical role of Rho-kinase and MEK/ERK pathways for angiotensin II-induced plasminogen activator inhibitor type-1 gene expression. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 21, 868-873.

Tangirala, R.K., Tsukamoto, K., Chun, S.H., Usher, D., Pure, E., et Rader, D.J. (1999). Regression of atherosclerosis induced by liver-directed gene transfer of apolipoprotein A-I in mice. *Circulation* 100, 1816-1822.

Taylor, W.R. (1998). Mechanical deformation of the arterial wall in hypertension: a mechanism for vascular pathology. *Am. J. Med. Sci.* 316, 156-161.

Thames, M.D. (1978). Contribution of cardiopulmonary baroreceptors to the control of the kidney. *Fed. Proc.* 37, 1209-1213.

Thames, M.D., et DiBonna, G.F. (1979). Renal nerves modulate the secretion of renin mediated by nonneural mechanisms. *Circ. Res.* 44, 645-652.

Thoren,P., Mark,A.L., Morgan, D.A., O'Neill,T.P., Needleman,,P., et Brody,M.J. (1986). Activation of vago; depressor reflexes by atriopeptins inhibits renal sympathetic nerve activity. *Am. J. Physiol.* 251, H1252-H1259.

Thubrikar,M.J., Baker,J.W., et Nolan,S.P. (1988). Inhibition of atherosclerosis associated with reduction of arterial intramural stress in rabbits. *Arteriosclerosis* 8, 410-420.

Thubrikar,M.J., Robicsek,F., et Fowler,B.L. (1994). Pressure trap created by vein valve closure and its role in graft stenosis. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 107, 707-716.

Thubrikar,M.J., Roskelley,S.K., et Eppink,R.T. (1990). Study of stress concentration in the walls of the bovine coronary arterial branch. *J. Biomech.* 23, 15-26.

Tigerstedt,R. et Bergman,P.G. (1898). Niere und Kreislauf. *Skand. Arch. Physiol.* 8, 223-271.

Touyz,R.M. et Schiffrin,E.L. (1999). Ang II-stimulated superoxide production is mediated via phospholipase D in human vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 34, 976-982.

Tummala,P.E., Chen,X.L., Sundell,C.L., Laursen,J.B., Hammes,C.P., Alexander,R.W., Harrison,D.G., et Medford,R.M. (1999). Angiotensin II induces vascular cell adhesion molecule-1 expression in rat vasculature: A potential link between the renin-angiotensin system and atherosclerosis. *Circulation* 100, 1223-1229.

Unger,T., Gohlke,P., Paul,M., et Rettig,R. (1991). Tissue renin-angiotensin systems: Fact or fiction. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 18, S20-S25.

van Kats,J.P., Methot,D., Paradis,P., Silversides,D.W., et Reudelhuber,T.L. (2001). Use of a biological peptide pump to study chronic peptide hormone action in transgenic mice. Direct and indirect effects of angiotensin II on the heart. *J. Biol. Chem.* 276, 44012-44017.

Villareal,D., Freeman,R.H., Davis,J.O., Verburg,K.M., et Vari,R.C. (1986). Renal mechanisms for suppression of renin secretion by atrial natriuretic factor. *Hypertension.* 8, II28-II35.

Voyiaziakis,E., Goldberg,I.J., Plump,A.S., Rubin,E.M., Breslow,J.L., et Huang,L.S. (1998). ApoA-I deficiency causes both hypertriglyceridemia and increased atherosclerosis in human apoB transgenic mice. *J. Lipid Res.* 39, 313-321.

Wachsmuth ED, Wust B. (1982). Stimulated murine peritoneal macrophages in suspension and cell culture: enzyme determinations by biochemical and histochemical means. *Histochem. J.* 14, 221-37.

Wang,D.L., Wung,B.S., Shyy,Y.J., Lin,C.F., Chao,Y.J., Usami,S., et Chien,S. (1995). Mechanical strain induces monocyte chemotactic protein-1 gene expression in

endothelial cells. Effects of mechanical strain on monocyte adhesion to endothelial cells. *Circ. Res.* 77, 294-302. Weiss, D., Kools, J.J., et Taylor, W.R. (2001). Angiotensin II-induced hypertension accelerates the development of atherosclerosis in apoE-deficient mice. *Circulation* 103, 448-454.

Wolf, G., Mentzel, S., et Assmann, K.J. (1997). Aminopeptidase A: a key enzyme in the intrarenal degradation of angiotensin II. *Exp. Nephrol.* 5, 364-9.

Wung, B.S., Cheng, J.J., Hsieh, H.J., Shyy, Y.J., et Wang, D.L. (1997). Cyclic strain-induced monocyte chemotactic protein-1 gene expression in endothelial cells involves reactive oxygen species activation of activator protein 1. *Circ. Res.* 81, 1-7.

Yamada, Y., Doi, T., Hamakubo, T., et Kodama, T. (1998). Scavenger receptor family proteins: roles for atherosclerosis, host defence and disorders of the central nervous system. *Cell Mol. Life Sci.* 54, 628-640.